

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA

Departamento de Química Farmacêutica e Terapêutica



**Desenvolvimento de ferramentas químicas para estudar o
mecanismo de acção de novas 4-aminoquinazolinas como
inibidores da fase hepática da malária**

André Filipe Raposo Moreira Dias

Tese orientada pelo Professor Doutor Rui Ferreira Alves Moreira
Co-orientada pela Doutora Ana Sofia Marques da Ressurreição

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa com vista à obtenção
do grau de Mestre em Química Farmacêutica e Terapêutica

Lisboa

2013

Aos meus pais

Agradecimentos

Antes de mais, gostaria para exprimir a minha gratidão com todos aqueles que, directa ou indirectamente, me apoiaram, aconselharam e incentivaram durante estes últimos anos. Sem a vossa ajuda este trabalho não poderia ter sido realizado.

Em primeiro lugar, um agradecimento muito especial à Doutora Ana Ressurreição porque sem ela este projecto não teria chegado onde chegou. Obrigado pelo constante apoio, dedicação e disponibilidade (e pelas chamadas de atenção, também foram muito importantes!). Pelos conselhos, críticas e sugestões a nível laboratorial, científico e pessoal que foram fundamentais para que eu, neste último ano, melhorasse como pessoa e químico, muito obrigado Ana!

Ao Professor Doutor Rui Moreira, pela sua permanente presença e orientação. Apesar de não partilharmos as mesmas preferências futebolísticas, nunca deixou de persistir comigo, pelo lado positivo, em momentos menos bons durante este projecto. Muito obrigado por todos os conhecimentos científicos proporcionados durante todo o mestrado!

Agradeço ao grupo do Dr. Miguel Prudêncio e à Inês Albuquerque (IMM) por terem efectuado os ensaios biológicos relacionados com a fase hepática e ao grupo do Dr. Thomas Hanscheid e à Carolina Tempera (IMM) pelos ensaios biológicos da fase sanguínea. À Dra. Lídia Gonçalves (FFUL) pelos ensaios de toxicidade e à Professora Rosário Bronze e ao Dr. João Ferreira (FFUL), do laboratório de espectrometria de massa.

Agradeço em geral ao laboratório dos professores Carlos Afonso e Pedro Góis por me terem recebido no último mês de prática laboratorial e pelas facilidades de acesso e disponibilidade do reactor de fotólise.

Não podia deixar de agradecer em particular, ao Ângelo Monteiro pelo grande amigo que foi durante todo o mestrado! A ele, à Ana Rita Duarte e ao Nuno Pereira, um meu especial obrigado, pelo constante apoio (principalmente no início), paciência, amizade e conselhos tanto a nível pessoal como profissional!

Não me posso esquecer de todas as pessoas que me ajudaram, dentro da faculdade, neste último ano e contribuíram para que, a todos os níveis, isto fosse possível. Marta Carrasco, Marta Figueiras, Rudi Oliveira, Daniela Miranda, Susana Dias Lucas, Eduardo Ruivo (chegaste tarde mas estiveste lá!), João Lavrado, Carlos Ribeiro, Fábio Santos, Roberta Paterna, Mariana Marques, Filipa Siopa, Mariana Reis, Ângela Paterna, Ana Catarina, Letícia Quental e Sr. Francisco, obrigado pelo companheirismo e boa disposição!

Ao grande Fausto Queda pelas longas noites de discussão e ideias sobre química orgânica (os velhos tempos). À Helena Coelho e ao João Cascão pelo importante apoio, amizade e motivação

nestes últimos anos! Aos meus amigos Bernardo Peres, à Débora Santos, à Raquel Batista, ao Jorge Filipe, ao Diogo Marques, à Sara Casinha e ao Evandro Brandão por me aturarem, sei que não é fácil, obrigado!

Ao meu pai, à minha mãe e irmão, muito obrigado por tudo até hoje, o investimento, a motivação, a força de vontade, o apoio, a paciência, a persistência, os conselhos e a amizade que tiveram comigo. Tudo foi importante para chegar aqui, o meu muitíssimo obrigado!

Índice Geral

Índice de Figuras	V
Índice de Tabelas	VII
Índice de Esquemas	VIII
Abreviaturas	XI
Resumo	XIV
Abstract	XV
Capítulo 1. Introdução geral.....	1
1.1 A malária	2
1.1.1. Agente Etiológico – género <i>Plasmodium</i>	4
1.1.2. Ciclo de vida do parasita <i>Plasmodium</i>	5
1.1.3. A Malária, o VIH e outras doenças	7
1.2. Terapia da malária	8
1.2.1. Fármacos antimaláricos	8
1.2.2. Resistência a antimaláricos	11
1.3. Fase hepática (FH) da malária	13
1.3.1. Possíveis novos alvos moleculares	13
1.3.2. Novos compostos activos na FH	14
1.3.3. Desenvolvimento/estratégias de pesquisa de novas moléculas	19
1.3.4. Quinazolinas	20
1.4. A química de “click” – Reacções Biortogonais na descoberta de mecanismos de acção de novas moléculas	23
1.4.1. As reacções Biortogonais	23
1.4.1.1. Condensação entre aldeídos/cetonas e nucleófilos amínicos	24
1.4.1.2. Ligação Staudinger entre azidas e fosfinas	25
1.4.1.3. Reacções entre azidas e alcinos	26

1.4.1.4. Reacções entre tetrazóis e alcenos	28
1.4.1.5. Outras reacções biortogonais com alcenos e alcinos	28
1.4.2 Ligações de tetrazina.....	29
1.4.3 “Turn-On Probe” – fluoróforo BODIPY-FL	31
1.4.4 Biomarcação por afinidade fotoquímica (“ <i>photoaffinity labeling</i> ”)	33
1.5 Objectivos	35
Capítulo 2. Síntese e Caracterização dos novos compostos de quinazolina	37
2.1 Síntese dos derivados de Quinazolina	38
2.1.1 Aminas primárias laterais.....	40
2.1.2 Síntese das Quinazolin-4(3 <i>H</i>)-onas	44
2.1.3 4-Aminoquinazolinas finais	47
Capítulo 3. Actividade biológica das 4-Aminoquinazolinas sintetizadas	55
3.1. Actividade antimalárica <i>in vitro</i> das 4-aminoquinazolinas finais e citotoxicidade	56
Capítulo 4. Síntese dos componentes da sonda molecular fluorescente	60
4.1 A sonda molecular fluorescente.....	61
4.1.1. Síntese do Fluoróforo BODIPY-FL.....	62
4.1.2. Síntese do derivado da tetrazina.....	65
4.1.3. Acoplamento Tetrazina-BODIPY-FL.....	68
4.1.4. Síntese do éster activado do <i>trans</i> -cicloocteno (TCO)	70
4.1.5. Síntese das quinazolinas para a sonda molecular.....	72
4.1.6. Síntese de sondas de foto-afinidade	74
Capítulo 5. Conclusões e perspectivas futuras.....	76
5.1 Conclusões gerais e prespectivas futuras.....	77
Capítulo 6. Parte Experimental	79
6.1. Geral	80
6.1.1. Reagentes e Solventes	80
6.1.2. Equipamento	80
6.1.3. Métodos.....	81
6.2. Síntese.....	82
6.2.1. Aminas laterais.....	82

6.2.1.1. 1-Nitro-4-fenoxibenzeno (105)	82
6.2.1.2. 4-Fenoxianilina (106)	82
6.2.1.3 4-Fenoxibenzonitrilo (107).....	83
6.2.1.4. 1-(4-Fenoxifenil)etanamina (108)	83
6.2.1.5. <i>terc</i> -Butil-(4-hidroxifenetil)carbamato (109)	84
6.2.1.6. <i>terc</i> -Butil-(4-fenoxifenetil)carbamato	84
6.2.1.7. 2-(4-Fenoxifenil)etan-1-aminio-2, 2, 2-trifluoroacetato (110).....	85
6.2.2. 2-Aminobenzamidas (111 - 116)	85
6.2.2.1. 2-Amino-5-bromobenzamida (111)	86
6.2.2.2. 2-Amino-5-clorobenzamida (112).....	86
6.2.2.3. 2-Amino-5-metoxibenzamida (113).....	86
6.2.2.4. 2-Amino-5-nitrobenzamida (114)	87
6.2.2.5. 2-Amino-4-clorobenzamida (115).....	87
6.2.2.6. 2-Amino-4-metoxibenzamida (116).....	88
6.2.3. Quinazolin-4(3H)-onas	88
6.2.3.1. 6-Bromoquinazolin-4(3H)-ona (117)	89
6.2.3.2. 6-Cloroquinazolin-4(3H)-ona (118)	89
6.2.3.3. 6-Metoxiquinazolin-4(3H)-ona (119).....	89
6.2.3.4. 6-Nitroquinazolin-4(3H)-ona (120).....	90
6.2.3.5. 7-Cloroquinazolin-4(3H)-ona (121)	90
6.2.3.6. 7-Metoxiquinazolin-4(3H)-ona (122).....	91
6.2.4. 4-Aminoquinazolin-4-aminas finais	91
6.2.4.1. <i>N</i> -(4-fenoxifenil)quinazolin-4-amina (123)	91
6.2.4.2. <i>N</i> -(4-Fenoxibenzil)quinazolin-4-amina (124)	92
6.2.4.3. 6-Bromo- <i>N</i> -(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (125).....	93
6.2.4.4. 6-Cloro- <i>N</i> -(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (126).....	94
6.2.4.5. 6-Metoxi- <i>N</i> -(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (127)	95
6.2.4.6. 7-Cloro- <i>N</i> -(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (128).....	96
6.2.4.7. 7-Metoxi- <i>N</i> -(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (129)	97
6.2.4.8. 6-Nitro- <i>N</i> -(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (130)	98
6.2.4.9. <i>N</i> ⁴ -(4-fenoxifenetil)quinazolin-4,6-diamina (93)	99
6.2.4.10. [<i>N</i> ⁴ -(4-fenoxifenetil)quinazolin-4,6-diamina]-Gly-Boc (145)	99
6.2.4.11. [<i>N</i> ⁴ -(4-fenoxifenetil)quinazolin-4,6-diamina]-Gly-TFA (146)	100
6.2.5. Fluoróforo BODIPY-FL	101
6.2.5.1. 3,5-Dimetil-1 <i>H</i> -pirrole-2-carbaldeído (133)	101
6.2.5.2. (<i>E</i>)-3-(1 <i>H</i> -Pirrol-2-il)acrilato de metilo (131).....	101

6.2.5.3. 3-(1 <i>H</i> -Pirrol-2-il)propanoato de metilo (132)	102
6.2.5.4. 3-[4,4-Difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-il]propanoato de metilo (135)	102
6.2.5.5. Ácido 3-[4,4-Difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-il]propiónico (136) - BODIPY-FL	103
6.2.5.6. 3-[4,4-Difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-il]propanoato de succinimidilo (137).....	104
6.2.6. Função <i>trans</i> -cicloocteno (TCO)	105
6.2.6.1. (Z)-Cicloocten-4-ol (142)	105
6.2.6.2. (E)-Cicloocten-4-ol (143).....	105
6.2.7. Tentativas do Éster activado do TCO	106
6.2.8. Tentativa de síntese da função tetrazina	107
6.2.8.1. Na ausência de catalisador	107
6.2.8.2. Na presença de catalisador	107
6.2.9. Tentativa de síntese do conjugado BODIPY FL-Tetrazina	110
6.2.10. Tentativa de síntese de uma sonda fotoquímica baseada numa benzofenona.....	111
6.2.10.1. Tentativa com nitrometano (CH ₃ NO ₂)	111
6.2.10.2. Tentativa com um via sintética alternativa.....	112
6.3. Estudos Biológicos	113
6.3.1. Ensaio de actividade biológica <i>in vitro</i> na FH.....	113
6.3.2. Ensaio de actividade biológica <i>in vitro</i> na FS	114
6.3.3. Ensaio de toxicidade <i>in vitro</i>	114
Capítulo 7. Bibliografia.....	116
Capítulo 8. Anexos.....	127

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Número de casos de malária reportados em 2011. Dados baseados na OMS, <i>World Malaria Report 2012</i> . Imagem adaptada da referência 6	3
Figura 1.2 - Representação esquemática do ciclo de vida do parasita <i>Plasmodium</i> no hospedeiro e no mosquito <i>Anopheles</i> . Imagem adaptada da referência 4	6
Figura 1.3 - Representação esquemática do ciclo de vida do parasita <i>Plasmodium</i> com os diferentes tipos de fármacos antimaláricos para as diferentes fases do ciclo no hospedeiro humano. Imagem adaptada da referência 1	8
Figura 1.4 - Estruturas dos principais fármacos utilizados no tratamento da malária.	9
Figura 1.5 - Potenciais inibidores específicos da fase hepática. Diagrama de Venn entre proteínas da fase hepática do <i>P. yoelii</i> e proteínas da fase sanguínea do <i>P. berghei</i> . Imagem adaptada da referência 51	14
Figura 1.6 - Novas 8-aminoquinolinas reportadas como possíveis fármacos profiláticos contra a malária.	15
Figura 1.7 - Outras estruturas reportadas como possíveis fármacos profiláticos contra a malária.	16
Figura 1.8 - Inibidores da FAS-II.	17
Figura 1.9 - Outros compostos activos na fase hepática do <i>Plasmodium</i> .	18
Figura 1.10 - Compostos saídos de <i>screenings</i> com actividade na FH.	20
Figura 1.11 - Exemplos de quinazolinas e seus derivados de 4-aminoquinazolina.	21
Figura 1.12 - Quinazolinas reportadas na literatura com actividade antimalárica. A 4-aminoquinazolina 93 resultou do <i>HTS</i> fenotípico com actividade antiplasmódica selectiva contra a FH do parasita (12 nM, <i>P. berghei</i>). 76	22
Figura 1.13 - Representação esquemática da química biortogonal na marcação de biomoléculas. O rectângulo azul representa o alvo molecular, o círculo amarelo o <i>repórter</i> químico, o rectângulo vermelho o segundo grupo funcional e a estrela verde representa a sonda fluorescente. Imagem adaptada da referência 105	24
Figura 1.14 - Alguns derivados do ciclooctino desenvolvidos para SPAAC.	27
Figura 1.15 - Fluoróforos mais comuns. No eixo horizontal está representado o comprimento de onda máximo de absorção e no eixo vertical está o brilho. Circundado a vermelho está o tipo de fluoróforo sintetizado neste trabalho. Imagem adaptada da referência 123	32
Figura 1.16 - Representação de uma bioconjugação por afinidade fotoquímica. O alvo (laranja) reage com o GFT a amarelo (pex. benzofenona, azida ou diazirina,	33

respectivamente) que pode, ou não, ser ajudado por um *repórter* químico e um fluoróforo via biortogonal. Imagem adaptada da referência 124

Figura 2.1 – Análise retrossintética para a síntese dos novos compostos derivados da quinazolina: **(a)** acoplamento quinazolínico final dos compostos; **(b)** intermediários 4-cloroquinazolínicos; **(c)** aminas primárias laterais. 39

Figura 2.2 – **a)** Representação parcial do espectro de ^1H -RMN dos compostos **105** (espectro a vermelho) e **107** (espectro a azul). **b)** Representação parcial do espectro bidimensional COSY (^1H - ^1H) do 4-fenoxi-1-nitrobenzeno, **105**. Os prótons de cada anel aromático apresentam uma cor característica, nomeadamente: a cor amarelo os prótons $\text{H}2'$ – $\text{H}4'$ e a cor castanho os prótons $\text{H}2$ e $\text{H}3$. 42

Figura 2.3 – **a)** Representação parcial do espectro de ^1H -RMN da 4-aminoquinazolina **123**. **b)** Representação parcial do espectro bidimensional COSY (^1H - ^1H) do composto **123**. Evidência das interações entre os prótons do sistema quinazolínico a azul. 48

Figura 2.4 – **a)** Representação parcial do espectro de ^1H -RMN do composto **125**. **b)** Representação parcial do espectro bidimensional COSY (^1H - ^1H) da 4-aminoquinazolina **125**. Evidência das interações entre os prótons do sistema quinazolínico a azul. 51

Figura 2.5 – Diagrama representativo do acoplamento entre o próton $\text{H}7$ e os prótons $\text{H}8$ e $\text{H}5$ da 4-aminoquinazolina **125**. 51

Figura 2.6 – Representação do acoplamento entre o próton $\text{H}2$ do sistema quinazolínico e o $\text{C}2$ do composto **125** através do espectro bidimensional de HMQC. Interação evidenciada a azul. 52

Figura 2.7 – Diagrama representativo do desdobramento expectável dos prótons: **(a)** $\text{H}4''$ e **(b)** $\text{H}2''$ das 4-aminoquinazolinas **93** e **125 – 130**. 53

Figura 2.8 – Diagrama representativo do acoplamento entre o próton $\text{H}\alpha$ e os prótons $\text{H}\beta$ e NH das 4-aminoquinazolinas **93** e **125 - 130**. **(a)** Acoplamento teórico; **(b)** Acoplamento visualizado experimentalmente. 53

Figura 2.9 – **a)** Representação parcial do espectro de ^1H -RMN dos compostos **130** e **93**. Os prótons do composto **130** estão a azul e do **93** estão a vermelho **b)** Representação parcial do espectro bidimensional HMBC do composto **93**. Correlação entre os prótons da amina e os carbonos $\text{C}5$ e $\text{C}7$ e interação do próton $\text{H}5$ que interage com o mesmo $\text{C}7$ e os dois carbonos quaternários adjacentes (verde). 54

Figura 3.1 – Estudo de relação estrutura-actividade dos compostos **93**, **ASR** e **123 – 129**. 59

Figura 4.1 – Análise retrossintética para a síntese da sonda molecular “*turn-on*”. 61

Figura 4.2 – **a)** Representação parcial do espectro de ^1H -RMN da tentativa 2 da Tabela 4.2. **b)** Representação parcial do espectro bidimensional COSY com possíveis interações entre prótons da molécula **141**. 69

Figura 4.3 **a)** Esquema reaccional da fotólise. **b)** Representação esquemática do sistema em contínuo da reacção de fotólise em **(a)** 71

Figura 5.1 - Alguns exemplos de quinazolininas activas contra a fase sanguínea presentes no arquivo do ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chemblntd>) **78**

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Principais fármacos antimaláricos usados presentemente no tratamento da malária, mecanismo e tipo de resistência que o <i>Plasmodium</i> desenvolveu.	12
Tabela 1.2 - Reactividade dos ciclooctinos funcionalizados representados na Figura 1.14. Adaptado da referência 111	27
Tabela 1.3 - Reactividade de derivados da tetrazina com alcenos em diferentes condições.	30
Tabela 2.1 – Rendimento, padrão espectral e respectivo desvio químico de ^1H -RMN para os prótons dos compostos 111 - 116 . O solvente utilizado foi DMSO- d_6 a uma frequência de 400 MHz.	45
Tabela 2.2. – Rendimento, padrão espectral e respectivo desvio químico de ^1H -RMN para os prótons dos compostos 117 - 122 . O solvente utilizado foi DMSO- d_6 a uma frequência de 400 MHz.	46
Tabela 2.3 – Rendimento, padrão espectral e respectivo desvio químico para os prótons do sistema quinazolinico dos compostos 125 – 131 . O solvente utilizado foi DMSO- d_6 a uma frequência de 400 MHz.	50
Tabela 2.4 – Padrão espectral e respectivo desvio químico de ^1H -RMN para os prótons das aminas laterais dos compostos 125 – 131 . O solvente utilizado foi DMSO- d_6 a uma frequência de 400 MHz.	52
Tabela 3.1 Actividade antimalárica das 4-aminoquinazolininas (93 , ASR e 123 - 129) contra a fase hepática e sanguínea (<i>P. berghei</i> e <i>P. falciparum</i> 3D7, respectivamente) da infecção, as suas toxicidades em células NIH3T3 e Hek293T, peso molecular, LogP e LogS.	57
Tabela 4.1 – Condições reaccionais das tentativas do passo <i>iii</i>) para obter o composto 139 .	67
Tabela 4.2 – Condições reaccionais das tentativas do Esquema 4.6.	68
Tabela 4.3 – Condições reaccionais das tentativas do passo <i>iii</i>) do Esquema 4.7.	72
Tabela 4.4 – Condições reaccionais das tentativas do passo <i>i</i>) do Esquema 4.9.	75
Tabela 6.1 - Condições reaccionais das tentativas de reacção do Esquema 6.1.	106

Tabela 6.2 – Condições reaccionais das tentativas para obter o composto 139 .	108
Tabela 6.3 - Condições reaccionais das tentativas de reacção do Esquema 6.2.	110
Tabela 6.4 - Condições reaccionais das tentativas de reacção do Esquema 6.3.	111

Índice de Esquemas

Esquema 1.1 - Representação geral da catálise ácida da condensação de aldeídos ou cetonas com nucleófilos de amina. O círculo vermelho representa o alvo molecular e a verde a sonda fluorescente.	25
Esquema 1.2 - Mecanismo geral da reacção de <i>Staudinger</i> .	25
Esquema 1.3 - Representação esquemática da ligação de <i>Staudinger</i> .	26
Esquema 1.4 - Esquema geral da cicloadição 1,3-dipolar fotoinduzida entre alcenos e tetrazóis.	28
Esquema 1.5 - a) Esquema geral da cicloadição 1,3-dipolar entre um derivado do ciclooctino e a nitrona. b) Cicloadição do norborneno.	29
Esquema 1.6 - Esquema geral de uma reacção de iEDDA entre uma tetrazina e um alceno com libertação de azoto molecular e posterior oxidação.	30
Esquema 1.7 - Fotólise da benzofenona com o ligando e posterior interacção com o alvo molecular. 126	34
Esquema 1.8 - Alterações a efectuar na molécula identificada pelo <i>screening</i> para o estudo de SAR.	36
Esquema 1.9 - Representação mecanística da reacção de cicloadição Diels-Alder inversa entre a <i>tetrazina/trans-cicloocteno</i> . A azul está representada a função TCO, a vermelho o fármaco em estudo (quinazolina), a preto a molécula de tetrazina e a verde o fluoróforo BODIPY-FL.	36
Esquema 2.1 - Reacções químicas efectuadas para obter as aminas laterais 106 , 108 e 110 . <u>Reagentes e condições</u> : i) CuI, Na ₂ CO ₃ , DMF, refluxo; ii) TES, Pd/C-10%, MeOH, t.a.; iii) Na ₂ CO ₃ , DMF, refluxo; iv) LiAlH ₄ , THF, t.a.; v) Boc ₂ O, Et ₃ N, H ₂ O/1,4-dioxano, t.a.; vi) Cu(OAc) ₂ , piridina, crivos moleculares 3Å, DCM, Ar-B(OH) ₂ , t.a.; vii) TFA, DCM, t.a.;	40

Esquema 2.2 – Mecanismo geral das reacções de substituição nucleofílica aromática activadas por grupos electroattractores. Ar = benzeno	41
Esquema 2.3 – Mecanismo geral do acoplamento <i>Chan-Lam</i> realizado no passo <i>vi</i> do Esquema 2.1. Ar = benzeno	43
Esquema 2.4 – Mecanismo geral da desprotecção do grupo <i>terc</i> -butilcarbamato com TFA.	44
Esquema 2.5. - Reacções químicas efectuadas para obter as quinazolin-4(3 <i>H</i>)-onas 117 - 122 . <u>Reagentes e condições:</u> (i) HOBt• α H ₂ O, EDC•HCl, DMF, NH ₃ 25 %, t.a.; (ii) CH(OMe) ₃ , HCl 37 %, t.a.;	44
Esquema 2.6 – Representação geral do mecanismo da reacção de ciclização do anel quinazolona dos compostos 117 - 122 , na presença de HCl e ortoformato de trimetilo.	46
Esquema 2.7 - Reacções químicas efectuadas na obtenção das 4-aminoquinazolin-4(3 <i>H</i>)-onas 93 e 123 – 130 . <u>Reagentes e condições:</u> (i) 4-cloroquinazolina comercial, aminas 106 e 108 , Et ₃ N, <i>i</i> -PrOH, 80 W, 80° C (ii) a- 117-122 , DIPEA, tolueno, refluxo; b- POCl ₃ , 80° C; (iii) sal de TFA 110 , Et ₃ N, DCM: <i>i</i> -PrOH (2:1), 50° C; (iv) H ₂ , Pd/C-10%, MeOH, t.a.	47
Esquema 2.8 – Representação mecanística da reacção de halogenação Vilsmeier do principal intermediário da substituição final, na presença de oxiclureto de fósforo e DIPEA.	49
Esquema 4.1 - Reacções químicas efectuadas na obtenção do éster activado do fluoróforo BODIPY-FL - 96 . <u>Reagentes e condições:</u> (i) acetato de trifenilfosforanilideno de metilo, DCM, t.a.; (ii) H ₂ , Pd/C 10%, MeOH, t.a.; (iii) POCl ₃ , DMF, t.a.; (iv; v) 3,5-dimetilpirrole-2-carbaldeído, POCl ₃ , DCM, t.a.; DIPEA, BF ₃ •OEt ₂ , t.a.; (vi) HCl 4,5 M, THF, t.a.; (vii) <i>N</i> -hidroxisuccinimida, DCC, ACN, t.a.	62
Esquema 4.2 - Mecanismo geral da reacção de Horner–Wadsworth–Emmons, na presença de um fosforano, para obter o intermediário 131 .	63
Esquema 4.3 - Mecanismo geral da reacção de formilação Vilsmeier-Haack, para obter o intermediário 133 .	63
Esquema 4.4 - Mecanismo geral da reacção de boração para obter o intermediário 135 .	64
Esquema 4.5 - Metodologia usada para obter a 3-(<i>p</i> -benzilamino)-1,2,4,5-tetrazina 140 . (i) Acetato de formamidina, S ₂ , (NH ₂) ₂ •H ₂ O, t.a.; (ii) Boc ₂ O, NaOH, H ₂ O, t.a.; (iii) acetato de formamidina, Zn(OTf) ₂ , (NH ₂) ₂ •H ₂ O, solvente e temperatura – Tabela 4.1.	66
Esquema 4.6 - Reacção química efectuada na tentativa de obter a molécula 141 . Nota: As bases usadas estão reportadas na Tabela 4.2.	68
Esquema 4.7 - Tentativa de síntese do éster activado do TCO 144 . (i) LiAlH ₄ /THF 1M, THF, t.a.; (ii) Benzoato de metilo, éter/ <i>n</i> -hexano (9:1) 0,015 M, fotólise, t.a.; (iii) CDS, base, ACN, t.a.	70
Esquema 4.8 - Metodologia e reacções químicas efectuadas na obtenção da quinazolina 146 . (i) Boc-Gly-OH, EDC•HCl, THF, t.a.; (ii) TFA, DCM, t.a.	73

Esquema 4.9 - Metodologia e reacções químicas efectuadas para tentar obter a sonda fotoquímica. (i) CH_3NO_2 , NaH 60%, solvente, t.a.; (ii) KCN, 1,4-Dioxano: H_2O (1:1), refluxo; (iii) H_2 , Pd/C – 10%, MeOH, 4,6 bar, t.a.; (iv) LiAlH_4 , THF, t.a.; (v) $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, refluxo, Dean-Stark;	74
Esquema 6.1. Reacção entre o TCO e o CDS, na presença de ACN e base (Et_3N ou DIPEA), sob atmosfera inerte e à t.a.	106
Esquema 6.2 - Reacção química efectuada na tentativa de obter a molécula 141 . Nota: As bases usadas estão reportadas na Tabela 6.3.	110
Esquema 6.3 - Tentativa de reacção entre a 4-(bromometil)benzofenona, o nirtometano, o NaH em solvente (THF, DMF, CH_3NO_2 – Tabela 6.4) sob atmosfera inerte e à t.a.	111
Esquema 6.4 - Tentativa de reacções numa via sintética diferente na síntese da sonda fotoquímica baseada na benzofenona.	112

Abreviaturas

ACN - Acetonitrilo

AcOEt – Acetato de Etilo

ACT – Terapia combinada de artemisinina (*Artemisinin-Combination Therapies*)

AOG - *N*-amino-*N'*-octilguanidina

Boc₂O – Di-*terc*-butilo dicarbonato

BODIPY FL - *B*oron-*D*IPYrrromethene *di*FLuoride

¹³C-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de carbono

CD₃CN – Acetonitrilo deuterado

CDS - Carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo

COSY – *C*Orrelation *S*pectroscopY

CQ - Cloroquina

CuAAC - *C*opper-catalyzed *A*zide-*A*lkyne 1,3-dipolar *C*ycloaddition

DCC – *N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida

DCM - Diclorometano

DHFR - Diidrofolato reductase (*DiHydroFolate Reductase*)

DHODH - Diidroorotato desidrogenase (*DiHydrOorotate DeHydrogenase*)

DIPEA – *N,N*-Diisopropiletilamina

DMF - Dimetilformamida

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDC•HCl – Hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida

EGFR - receptor do factor de crescimento epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

ESI-MS - *E*lectro*S*pray *I*onization-*M*ass *S*pectroscopy

Et₃N - Trietilamina

EtOH - Etanol

FAS-II - *F*atty *A*cid *S*ynthase II

FDA - *F*ood and *D*rug *A*ministration

FEE - Forma exo-eritrocitária

FH – Fase Hepática

FS – Fase Sanguínea

G6PD – glucose-6-fosfato-desidrogenase

GFR – Grupos fotoreactivos

Gly - Glicina

HDAC - Histona desacetilase

hERG - *Human Ether-a-go-go-Related Gene*

¹H-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de próton

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HMQC – *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*

HOBt - Hidroxibenzotriazole

HOMO - *Highest Occupied Molecular Orbital*

HPLC - *High-Pressure Liquid Chromatography*

Hsp90 - Chaperona 90 (*Heat Shock Protein 90*)

HTS - *High-throughput screening*

IC₅₀ – concentração inibitória 50%

iEDDA – Reacção Diels-Alder inversa (*Inverse Electron Demand Diels–Alder*)

i-PrOH – isopropanol

IS – Índice de Selectividade

IV - InfraVermelho

J – Constante de Acoplamento

LiAlH₄ – Hidreto de Alumínio Lítio

LUMO - Lowest Unoccupied Molecular Orbital

m/z – razão entre massa e carga do ião

MB – Mega Bases

MCM – Meio de Cultura Malária

MeOH - Metanol

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

Na₂CO₃ – Bicarbonato de sódio

NAD(P)-H

nF-κB – Factor Nuclear *kappa*B

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Tampão de Fosfato Isotônico (*Phosphate Buffer Saline*)

POCl₃ – Oxicloreto de Fósforo

Ppm – partes por milhão

PQ - primaquina

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SAR – Relação Estrutura-Actividade (*Structure Activity-Relationship*)

SERCA – ATPase envolvida no transporte de Ca²⁺ ao nível do retículo sacroplasmático

SN₂ – Substituição Nucleofílica Bimolecular

SN_{Ar} – Substituição Nucleofílica Aromática

SPAAC - *Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition*

t.a. – temperature ambiente

TCO – *trans*-cicloonteno

TES - trietilsilano

THF - tetrahidrofurano

TLC – cromatografia de camada fina

UV-Vis – ultraviolet-visível

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

δ – desvio químico

Resumo

A malária ou paludismo é uma doença infecciosa provocada por parasitas do género *Plasmodium* que é transmitida pela picada do mosquito fêmea do género *Anopheles*. A malária é uma das infecções que mais se propaga por todo o mundo. No entanto, apesar da propagação ter diminuído nos últimos anos, actualmente existem mais pessoas em risco de serem infectadas do que em qualquer outro período temporal. Em 2012, a Organização Mundial de Saúde (OMS) contabilizou 104 países onde a malária é endémica. Globalmente, cerca de 3,3 biliões de pessoas estão em risco de contrair malária, afectando mais de 40% da população mundial, principalmente crianças com menos de 5 anos, mulheres grávidas e respectivos fetos.

Apesar da enorme variedade de compostos com actividade antimalárica, a sua grande maioria está descrita como inibidora da fase sanguínea, sendo a fase hepática um estágio da infecção pouco explorado até ao momento. Só recentemente, a investigação começou a dar mais atenção a esta fase da doença, principalmente devido às suas vantagens profiláticas. O presente trabalho focou-se na síntese de novos compostos derivados da 4-aminoquinazolina baseados numa molécula eleita através de um *screening* fenotípico da fase hepática do ciclo de vida do parasita *Plasmodium*. De igual forma, este trabalho incidiu no desenvolvimento de novos antimaláricos como inibidores selectivos da fase hepática do parasita (estudo de SAR), explorando então, as características profiláticas das 4-aminoquinazolinas.

As 4-aminoquinazolinas **93** e **123 – 129** foram sintetizadas com bons rendimentos e avaliadas quanto às suas actividades antiplasmódicas e citotóxicas em linhas celulares de mamífero. O composto mais activo e selectivo para a fase hepática, desta série, foi o **125** com um $IC_{50} = 5$ nM e um índice de selectividade superior a 10,000. Este composto, que contém uma cadeia alquílica lateral com dois carbonos e um átomo de bromo na posição 6 do anel de quinazolina, demonstrou uma actividade *in vitro* significativamente superior à primaquina ($IC_{50} = 7500$ nM). O estudo de SAR revelou que cadeias alquílicas laterais menores diminuem a actividade e substituintes electroatractores e electrodadores nas posições 6 e 7 da função quinazolina potenciam a actividade antiplasmódica.

Finalmente, com o intuito de estudar o modo de actuação destes compostos selectivos para a fase hepática, foi proposto explorar novas “ferramentas químicas” para descobrir mais informação sobre o mecanismo de acção destas moléculas. Foram aplicadas metodologias descritas na literatura para a síntese de uma sonda baseada na fluorescência (“*turn-on*”), onde através de uma reacção biortogonal entre uma tetrazina (acoplada a um fluoróforo - BODIPY) e uma função *trans*-cicloocteno acoplado à 4-aminoquinazolina em estudo se pode visualizar através de microscopia a zona de actuação do fármaco. Também foi desenvolvida uma metodologia para a síntese de uma sonda de fotoafinidade.

Palavras-Chave: malária, fase hepática, selectividade, 4-aminoquinazolina, SAR, sonda molecular fluorescente, tetrazina, *trans*-cicloocteno (TCO).

Abstract

Malaria is an infectious disease caused by parasites of genus *Plasmodium* and transmitted by the bite of female mosquito of the genus *Anopheles*. Malaria is one of the most spread infections around the world. However, although the rate of infected people has decreased, in recent years, there are now more people at risk of contamination with malaria than at any other time point. In 2012, World Health Organization (WHO) reported 104 countries where malaria is endemic. Globally, about 3.3 billion people are at risk of contracting malaria, affecting more than 40% of the world population, particularly children under 5 years old, pregnant women and their fetuses.

Despite the large variety of compounds with antimalarial activity, most of them are act only against erythrocytic stage parasites. The liver stage of infection is still underexploited as a drug target. Only recently, research in antimalarial drug discovery is paying more attention to this stage of the disease, mainly due to its prophylactic benefits. The present work has focused on the synthesis of new 4-aminoquinazolines based on a hit discovered by a high-throughput phenotypic screening for the liver stage of *Plasmodium*. Similarly, this work focused on the development of new selective inhibitors of the liver stage of the malaria parasite, exploring the prophylactic features of the 4-aminoquinazolines through a structure activity relationship study (SAR).

The 4-aminoquinazolines **93** and **123-129** were synthesized in good yields and evaluated for their antiplasmodial and cytotoxic (mammalian cell lines) activities. The most active and selective compound in this series was compound **125** with an $IC_{50} = 5$ nM and a selectivity index higher than 10000. This compound contains an alkyl side chain with two carbons and a bromine at 6-position of the quinazoline moiety and was shown to be significantly more potent than primaquine ($IC_{50} = 7500$ nM). The SAR study revealed that lower alkyl side chains decrease the activity and electron withdrawing groups and electron donor groups at the 6- and 7-positions of the quinazoline moiety, improve antiplasmodial activity.

Finally, in order to study the mechanism of action of these potent compounds, it was proposed to explore new chemical tools to find out more information about the mechanism of action of these molecules. With the purpose of performing *in vivo* imaging, it were applied methodologies described in the literature to synthesize a “turn-on” probe, exploring the bioorthogonal reaction between a tetrazine (coupled to a BODIPY fluorophore) and a *trans*-cyclooctene function coupled to the 4-aminoquinazoline. A methodology for the synthesis of a photoaffinity-based probe has also been explored.

Keywords: malaria, liver stage, selectivity, 4-aminoquinazoline, SAR, “turn-on” probe, tetrazine, *trans*-cyclooctene (TCO).

Capítulo 1

Introdução geral

1.1 A malária

A malária é uma das doenças infecciosas que, quer a nível social e/ou económico mais impacto causa nos dias de hoje.^{1,2} Tal facto faz da malária mais uma barreira contra o desenvolvimento humano. As alterações ambientais, incluindo o aquecimento global, distúrbios civis, imigração e resistência a fármacos são algumas das razões que dificultam o combate a esta infecção, principalmente nos países subdesenvolvidos.^{2,3}

A infecção por malária é causada por um protozoário intracelular eucariótico do género *Plasmodium* que é transmitido ao ser humano (hospedeiro) pela picada de um mosquito fêmea do género *Anopheles*, o qual funciona, simultaneamente, como vector e reservatório da doença. Após a picada do mosquito, os parasitas entram na circulação sanguínea dirigindo-se aos hepatócitos, onde se multiplicam, dando origem à fase hepática (FH) da doença, que é assintomática. De seguida, invadem os glóbulos vermelhos onde se maturam e originam novos parasitas capazes de invadir novos glóbulos vermelhos, sendo esta a fase sanguínea (FS) que se reflecte em sintomas como dores de cabeça, cansaço, febre, palidez, calafrios e em casos mais graves choque, síncope, coma, edema pulmonar e danos renais e hepáticos.^{4,5}

É importante realçar que, sendo uma doença infecciosa a transmissão da malária apenas acontece através da picada do mosquito fêmea *Anopheles*. Não existe transmissão directa da doença de pessoa para pessoa e muito raramente pode ocorrer a transmissão por meio de transfusão de sangue contaminado, do uso compartilhado de seringas contaminadas ou transmissão congénita.^{2,6}

Quanto aos factos epidemiológicos desta doença, a incidência global da malária tem vindo a diminuir ao longo dos últimos 60 anos, embora presentemente existam mais pessoas em risco de serem infectadas pelo mosquito do que em qualquer outro momento da história da malária. Em 2012, a OMS contabilizou 104 países onde a malária é endémica.^{6,7} Globalmente, cerca de 3,3 biliões de pessoas estão em risco de contrair malária, afectando mais de 40% da população mundial. Anualmente, desde 2011, estimam-se 219 milhões de novos casos e aproximadamente cerca de 700 mil mortes, sendo que muitas delas são crianças com menos de 5 anos de idade no continente africano.^{6,7} A malária é particularmente preocupante na África Subsariana, ocorrendo nesta zona cerca de 90% dos casos reportados, estando entre estes mulheres grávidas e respectivos fetos. No Sudoeste Asiático conhecem-se cerca de 6% dos casos, 2% em algumas regiões do Mediterrâneo Oriental e Ocidental e ~1% na América do Sul e Central – Figura 1.1.⁷

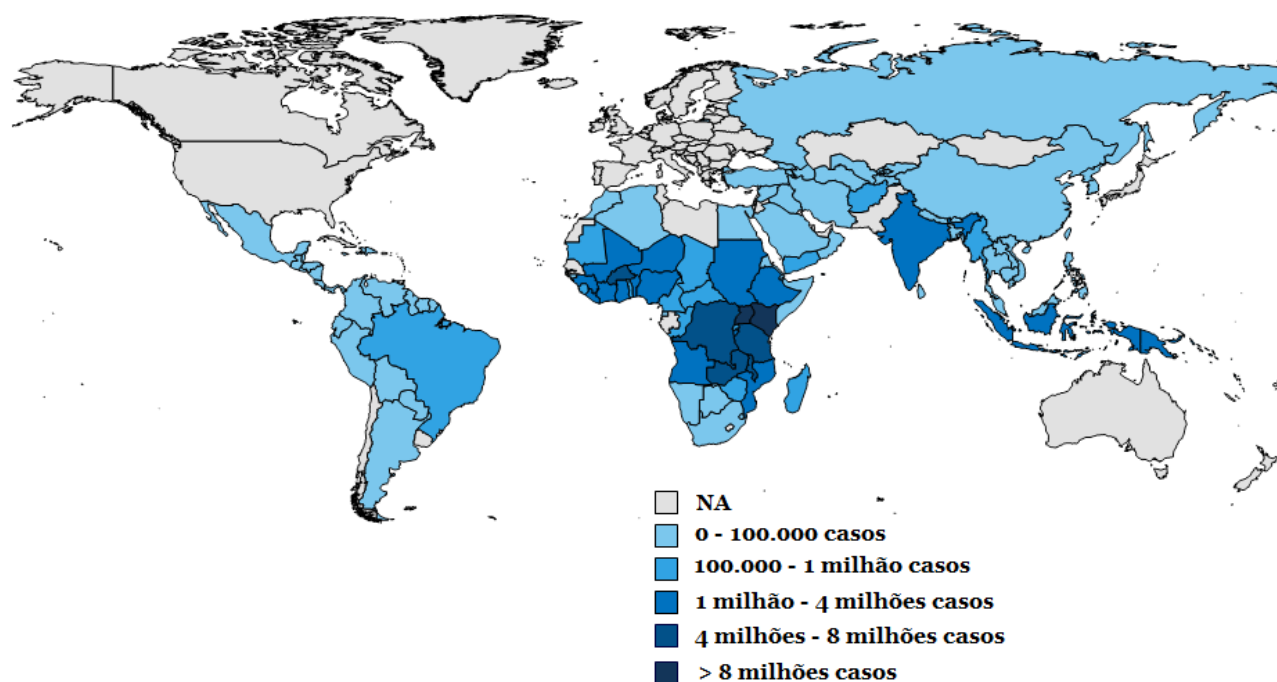


Figura 1.1. Número de casos de malária reportados em 2011. Dados baseados na OMS, *World Malaria Report 2012*. Imagem adaptada da referência 6

Através destes dados epidemiológicos é possível verificar que a malária é uma doença devastadora, com elevado grau de morbidade e mortalidade.⁸⁻¹⁰ Consequentemente, nos últimos anos, a malária, reuniu a atenção por parte de todo o mundo e projectos como *Global Malaria Action Plan - Roll Back Malaria* (financiado pela OMS), programa de erradicação de malária *Bill and Melinda Gates Foundation*, *Millenium Development Goals* e *Malaria Eradication Scientific Alliance* (MESA)¹¹⁻¹⁴ têm contribuído para o reinvestimento na investigação desta doença. Tal como foi enumerado anteriormente, as alterações climáticas, resistência a fármacos, conflitos e guerras civis são razões para a incidência da malária ser elevada em África, onde os serviços de saúde são escassos e ineficazes.^{2,6} Além disso, a malária e o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) podem interagir de inúmeras maneiras aumentando a carga viral e consequentemente as febres, conduzindo a um aumento do risco de malária.¹⁵

A luta global contra a malária requer uma abordagem ampla. Actualmente está disponível uma grande variedade de ferramentas eficazes, que incluem insecticidas para prevenir e medicamentos para tratar e prevenir a infecção.^{9,16} Apesar disso, tem sido estimulante tentar desenvolver uma profilaxia a longo prazo através da vacinação, dado que o parasita tem vários mecanismos sofisticados para evitar o sistema imunitário humano.^{17,18} Até agora, a vacina mais eficaz em desenvolvimento está em ensaios clínicos de Fase III. A GlaxoSmithKline (GSK) *RTS,S* reduz o risco de malária e atrasa o tempo para uma nova infecção.¹⁹ No entanto, ainda existe um longo caminho a percorrer dado que existe um elevado número de pacientes que podem vir a sofrer desta

doença nos próximos anos. Assim, com o objectivo de erradicar a malária, a descoberta de novos fármacos antimaláricos deve continuar com o desenvolvimento de novas moléculas que visem prevenir e/ou tratar a malária, quer superando a resistência, bloqueando a transmissão do parasita para outras pessoas via mosquito ou usando como alvo terapêutico as várias fases da doença.

Relativamente ao parasita, existem diversas espécies, sendo o *Plasmodium falciparum* o mais virulento e fatal dos parasitas que causam a malária. Cerca de 10-40% dos casos de malária severa (tipo de malária mais grave) causada pelo *P. falciparum* pode ser letal, pois pode levar a uma elevada taxa de parasitemia agregando-se às células endoteliais que conduz à falência de órgãos.³

1.1.1. Agente Etiológico – género *Plasmodium*

A malária tem como agente etiológico um parasita unicelular protozoário do género *Plasmodium*, sendo este transmitido ao hospedeiro pela picada de um mosquito fêmea infectado, *Anopheles* sp..^{4,20} Existem aproximadamente 400 espécies deste mosquito por todo o mundo, sendo que destas, apenas 60 são consideradas vectores do parasita.²¹ O facto de existir uma grande variedade de espécies do mosquito *Anopheles* faz com que exista um elevado número de diferentes espécies do parasita com as mais variadíssimas características, dificultando assim, o controlo e a erradicação da doença.

Relativamente ao parasita *Plasmodium*, são conhecidas cerca de 120 espécies capazes de infectar diferentes tipos de animais como répteis, pássaros e outros mamíferos. No entanto, mas apenas cinco espécies têm a capacidade de transmitir a infecção ao ser humano: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e mais ocasionalmente *Plasmodium knowlesi*. Todas estas cinco espécies são morfológica e imunologicamente diferentes, tal como a sua distribuição geográfica e resposta aos diferentes fármacos.²¹

Das cinco espécies de *Plasmodium* referidas, o *P. falciparum* é a mais grave, sendo mesmo a principal causa de morte por malária a nível global (cerca de 90% dos casos reportados).³ Esta espécie de *Plasmodium* pode causar falência de órgãos (malária severa) ou, por vezes, os glóbulos vermelhos infectados pelo *P. falciparum* podem obstruir vasos sanguíneos e, se isso ocorrer no cérebro, os indivíduos infectados podem morrer de malária cerebral. O *P. vivax* é o parasita mais abundante, identificado em áreas fora do continente africano e embora as suas infecções raramente sejam fatais é altamente incapacitante, podendo provocar danos futuros na vida dos indivíduos infectados. O parasita menos comum da malária é o *P. ovale* que é restrito à África Ocidental, enquanto que o *P. malariae* é encontrado por todo o mundo, embora, também com baixa frequência. Esta última espécie pode provocar uma infecção fixando-se durante um longo período de tempo na fase sanguínea, e se não for tratada, pode persistir de forma assintomática no

hospedeiro humano durante décadas. Quanto às espécies *P. ovale* e *P. vivax* têm a capacidade de entrar num estado de latência sob a forma de hipnozoítos, na fase hepática, podendo permanecer neste órgão durante um período de tempo que vai de semanas a anos antes do início de um novo ciclo de esquizogonia pré-eritrocitária, resultando assim, numa difícil erradicação destas espécies.^{2,3,5}

1.1.2. Ciclo de vida do parasita *Plasmodium*

A infecção por malária depende das interações que ocorrem entre o parasita e o hospedeiro. Cada fase da infecção causada pelo *Plasmodium* baseia-se, em diferentes passos, com a presença de moléculas do hospedeiro que permitem ou facilitam a sua invasão, sobrevivência e multiplicação.⁸ Assim, todas as espécies do *Plasmodium* têm um ciclo de vida composto por uma fase sexuada exógena (esporogonia) com a replicação no mosquito fêmea *Anopheles* e uma fase assexuada endógena (esquizogonia) com a replicação a acontecer no hospedeiro. Esta última fase inclui a fase pré-eritrocítica nas células hepáticas do fígado e a fase eritrocítica nos glóbulos vermelhos.²¹ O ciclo infeccioso no hospedeiro (Figura 1.2a) começa com a picada de um mosquito fêmea *Anopheles* infectado (I) e consequente inoculação do parasita, presente nas glândulas salivares sob a forma de esporozoítos (II). Ao mesmo tempo que suga o sangue do hospedeiro, o mosquito deposita na corrente sanguínea uma média de 15-123 esporozoítos (III) que migram directamente para o fígado num espaço de 30 minutos.²² Ao chegar às células hepáticas do fígado, o parasita evolui para uma forma exo-eritrocitária (FEE) intermédia, formando um vacúolo parasitóforo. Nesta fase, multiplica-se e dá origem a esquizontes multinucleados contendo 10 – 30 mil merozoítos (IV).⁴ A fase hepática ou pré-eritrocítica (Figura 1.2b) é assintomática e tem um tempo de incubação entre 6 a 21 dias, dependendo da espécie de *Plasmodium* que infectou o hospedeiro. A título de curiosidade, nas espécies de *Plasmodium vivax* e *ovale* alguns esporozoítos entram num estado de dormência indeterminado que pode durar de semanas a anos, chamando-se a estas formas latentes, hipnozoítos.^{22,23}

Após a fase hepática, quando os esquizontes maturam, provocam a ruptura das células hepáticas (V), ocorrendo assim, a libertação de milhares de merozoítos para a corrente sanguínea infectando os glóbulos vermelhos do hospedeiro (VI) – fase sanguínea ou eritrocítica (Figura 1.2c).²⁴ Se esta fase não for tratada, os parasitas multiplicam-se dentro dos glóbulos vermelhos, cerca 10 vezes mais a cada dois dias, levando assim, a um elevado grau de parasitemia e conduzindo em poucos dias aos sintomas associados, podendo complicar-se e originar a morte.²⁵ No interior dos eritrócitos, o parasita degrada a hemoglobina da célula hospedeira desenvolvendo os merozoítos que formam o trofozoíto (VII). Depois de uma replicação assexuada, o trofozoíto dá

origem a novos esquizontes (**VIII**) que, quando maduros rompem os eritrócitos libertando novos merozoítos na corrente sanguínea (**IX**). O rápido aumento de novos merozoítos livres na corrente sanguínea origina os primeiros ciclos periódicos febris observados clinicamente.²¹

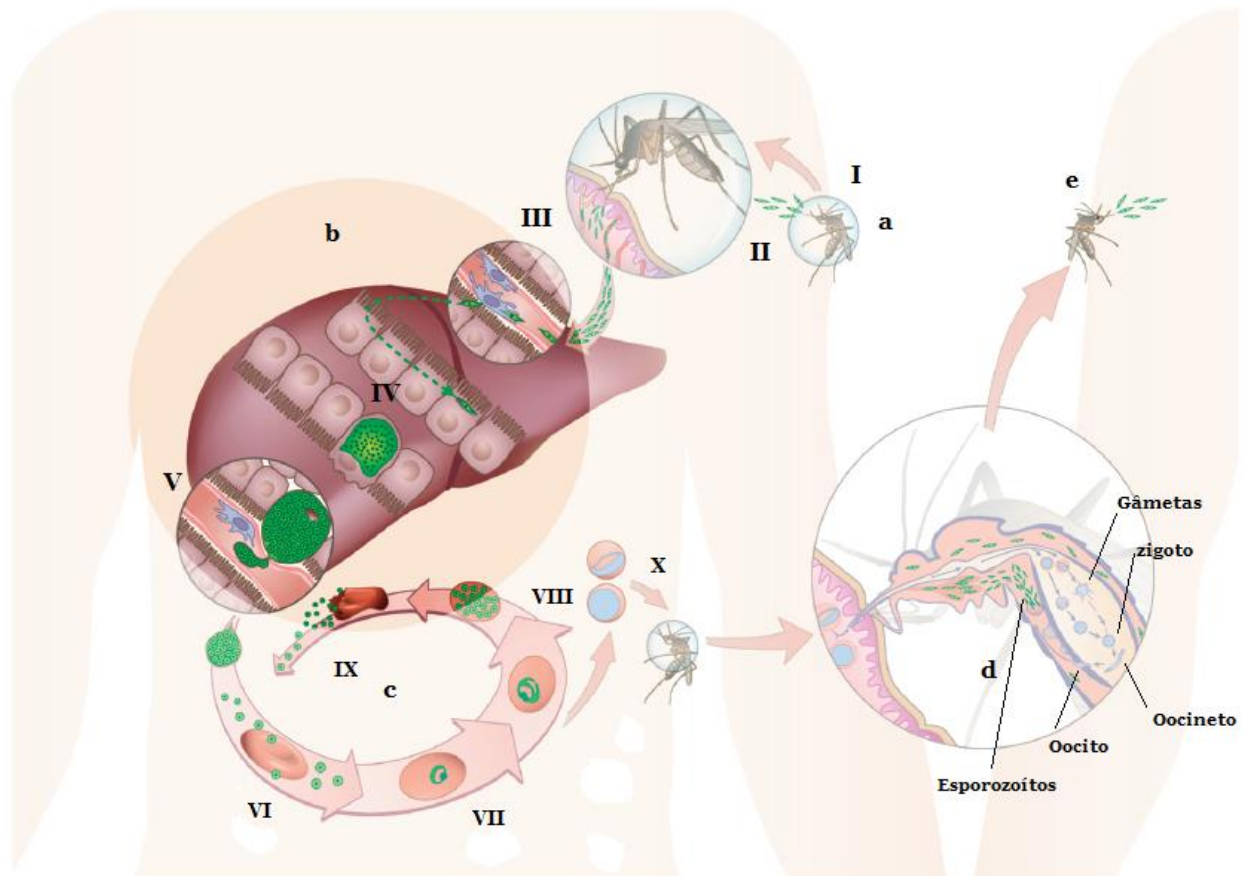


Figura 1.2 - Representação esquemática do ciclo de vida do parasita *Plasmodium* no hospedeiro e no mosquito *Anopheles*. Imagem adaptada da referência. 4

Alguns merozoítos que infectaram os glóbulos vermelhos dão origem a gametócitos sexuais (masculinos e femininos), entrando num novo parasita na fase sexual do ciclo infeccioso. Os gametócitos não causam ruptura dos eritrócitos, o que possibilita a sua posterior ingestão por um novo mosquito *Anopheles* durante a hemofagia (**X**). Já no interior do aparelho digestivo do novo mosquito, os gametócitos completam o seu ciclo sexual, onde os gametas masculinos e femininos se fundem formando o zigoto. O zigoto desenvolve-se então num oocineto móvel que se insere na hemocele (parede do estômago do vector), originando um oocisto que, após a divisão meiótica, origina esporozoítos (Figura 1.2d). Estes promovem a ruptura da parede do oocisto e, quando livres em circulação, migram para as glândulas salivares do vector, estando prontos a renovar o ciclo novamente num novo hospedeiro (Figura 1.2e).^{21,26}

1.1.3. A Malária, o VIH e outras doenças

Tal como já foi referido anteriormente, a malária é considerada, correntemente, uma das doenças infecciosas mais preocupantes a nível global e, em conjunto com o VIH são responsáveis por causar mais de 4 milhões de mortes por ano. As potenciais consequências e impacto na saúde pública da sua distribuição geográfica têm sido estudadas nos últimos anos. As duas doenças são consideradas uma causa e consequência da pobreza, sendo a África Subsariana, o Sudoeste Asiático e a América do Sul as regiões mais afectadas, pois interacções entre as duas doenças foram encontradas devido à vulnerabilidade do hospedeiro à infecção.²⁷

Estas duas infecções interagem sinérgica e bidireccionalmente uma com a outra. A infecção pelo VIH é um factor de risco para a malária clínica e severa, tal como a infecção pelo *P. falciparum* é um factor de risco para o aumento da carga viral do VIH, pois diminui o número de células T-CD4 e faz progredir a doença. Por outro lado, os indivíduos que são considerados semi-imunes à malária (zonas onde a malária é endémica) podem desenvolver esta infecção mais facilmente se estiverem infectados pelo VIH, dado que o seu sistema autoimune está mais fragilizado. Também a infecção por malária está associada à activação celular CD4+ e à supregulação de citocinas pró-regulatórias, que fornecem um microambiente ideal para a disseminação do vírus entre as células T-CD4 e, consequentemente, uma rápida replicação do VIH.¹⁵

Outras doenças que afectam os eritrócitos estão também interligadas à infecção por malária, como é o exemplo da anemia. A anemia ocorre quando a disrupção dos eritrócitos aumenta e/ou a produção dos mesmos é diminuída. Na infecção por malária, ambos os acontecimentos estão envolvidos, dado que a anemia malárica é responsável pela destruição intravascular e extravascular dos eritrócitos, quer estejam infectados ou não. A anemia malárica é também responsável pela diminuição da produção de eritrócitos devido à incapacitação da medula óssea.^{28,29}

Segundo a OMS, o número de casos em que a malária se relaciona com outras doenças têm vindo a diminuir.^{3,7} No entanto, para além dos fármacos antimaláricos disponíveis, é necessário continuar a investir no desenvolvimento de novas terapias e soluções para que estes números se mantenham ou possam mesmo baixar, uma vez que, a resistência adquirida pelo *P. falciparum* é um obstáculo ao combate destas doenças.³⁰⁻³³

1.2. Terapia da malária

1.2.1. Fármacos antimaláricos

Os fármacos antimaláricos estão tradicionalmente classificados de acordo com a fase do ciclo de vida do *Plasmodium* sobre a qual actuam (Figura 1.3).^{16,34} Um dos fármacos mais usados até à data foi a quinina, um produto natural extraído da casca da árvore *Cinchona calisaya* e que serviu de base para o desenvolvimento de outros fármacos antimaláricos.^{16,35} O desenvolvimento de novos fármacos pode adoptar várias estratégias, desde a modificação de moléculas já existentes formando novos compostos que actuam em diferentes alvos até à identificação de novos alvos terapêuticos, desenvolvendo compostos específicos que actuem ao nível dos mesmos. A título de exemplo, a cloroquina (CQ) é uma 4-aminoquinolina sinteticamente derivada da quinina e foi o primeiro antimalárico a ser desenvolvido.^{12,18,35}

Segundo a classificação dos fármacos antimaláricos, hoje em dia, os mais utilizados são os esquizonticidas sanguíneos ou agentes supressores que actuam nas formas assexuadas intra-eritrocíticas das espécies *Plasmodium* (trofozoítos e esquizontes). Os esquizonticidas tecidulares dividem-se em: i) primários ou fármacos profiláticos causais, quando actuam sobre as formas parasitárias pré-eritrocíticas; ii) secundários se actuarem sobre as formas parasitárias exo-eritrocíticas latentes das espécies *P. vivax* e *P. malariae* evitando recaídas na infecção. Os gametocitocidas actuam nas formas sexuais intra-eritrocíticas do parasita e os esporonticidas inibem o desenvolvimento das formas esporogénicas no vector evitando a transmissão da doença ao hospedeiro humano.^{34,36}

Da classe dos esquizonticidas tecidulares fazem parte os fármacos da família dos antifolatos e das 8-aminoquinolinas. A atovaquona (**1**, Figura 1.4) é uma naftoquinona inibidora do complexo bc_1 do parasita da malária que pode ser combinada com o proguanil **2** (antifolato). Os antifolatos (**2-5**, Figura 1.4.) são alguns dos fármacos antimaláricos

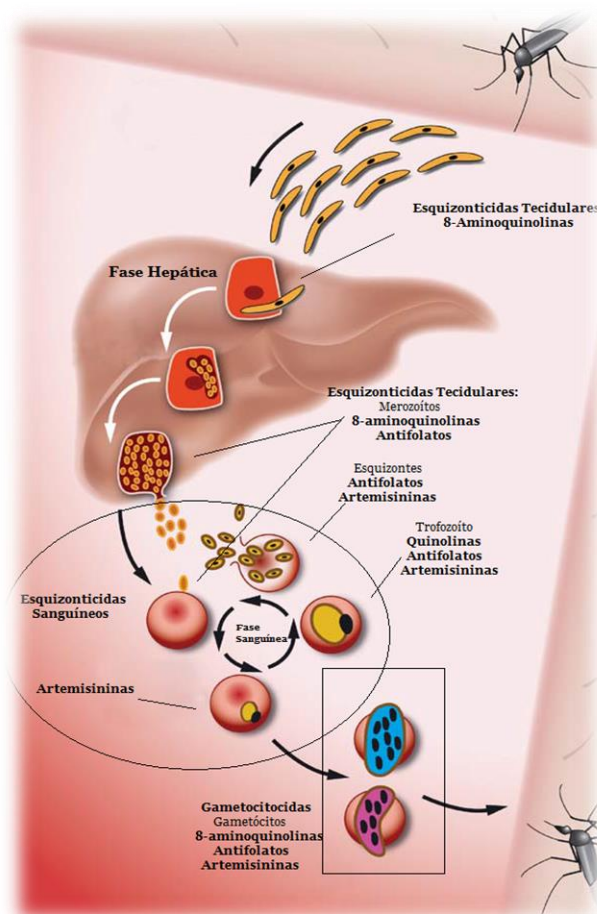


Figura 1.3 - Representação esquemática do ciclo de vida do parasita *Plasmodium* com os diferentes tipos de fármacos antimaláricos para as diferentes fases do ciclo no hospedeiro humano. Imagem adaptada da referência 1

mais usados, que inibem a via do folato. A utilização destes fármacos diminui a síntese de pirimidina, reduzindo a síntese de ADN, serina e a formação da metionina. A actividade destes compostos é exercida em todas as fases de desenvolvimento do *Plasmodium* sp., tal como os esquizotónicas sanguíneos e os gametocitocidas, embora o papel destes fármacos esteja em risco devido ao aparecimento de resistência.¹²

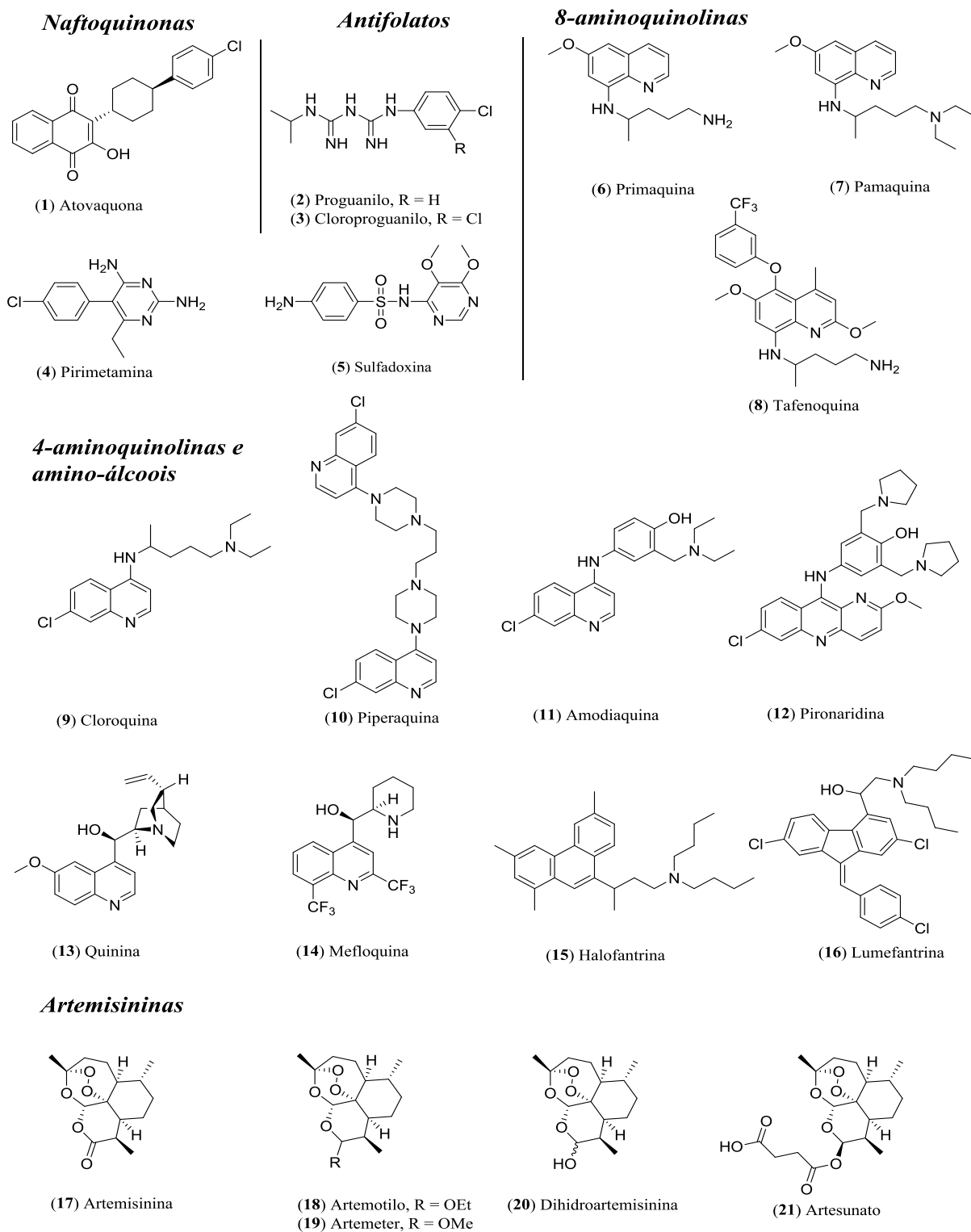


Figura 1.4 - Estruturas dos principais fármacos utilizados no tratamento da malária.

As 8-aminoquinolinas (**6-8**, Figura 1.4) actuam nas fases pré-eritrocítica e de transmissão do ciclo de vida, sendo a única classe de compostos capaz de exercer actividade antiplasmódica em formas latentes do parasita (hipnozoítos). O mecanismo de acção provável deste tipo de compostos é a ruptura da função mitocondrial, provocando o inchaço e o engrossamento da mitocôndria na fase tecidular do parasita.^{12,18,37}

Os esquizotéricos sanguíneos são a principal classe de fármacos antimaláricos e incluem compostos da família dos antifolatos, aminoquinolinas, amino-álcoois (**9 – 16**, Figura 1.4) e artemisininas (**17 – 21**, Figura 1.4.). A classe de fármacos que contem a função quinolina inclui alguns dos compostos antimaláricos mais comuns, sendo o seu local de actuação, o vacúolo digestivo do parasita.³⁸ Este tipo de fármacos actuam na via de destoxificação do *hemo*, pois a maioria deles só são activos na fase em que o parasita degrada a hemoglobina. Um facto interessante deste tipo de compostos é que os alvos terapêuticos das quinolinas não existem em concentrações necessárias no hospedeiro humano sob condições fisiológicas, aumentando assim a selectividade das quinolinas para o *Plasmodium*.^{13,16,34} Assim, esses alvos continuam a ser os melhores alvos moleculares em comparação com algumas enzimas presentes tanto no parasita como no hospedeiro humano (várias proteases³⁹, farnesil-trasferases³⁸ e outras enzimas envolvidas na absorção de colina³⁸).

Os compostos baseados na artemisinina, apresentam actualmente, a maior taxa de redução de parasitemia e actuam na fase intra-eritrocítica e nas formas sexuais do *Plasmodium*, sendo ao mesmo tempo esquizotéricos sanguíneos e gametocitocidas. O farmacóforo na artemisinina é a função 1,2,4-trioxano, que é uma ligação endoperoxídica crucial à actividade antiplasmódica. Tanto a artemisinina como os seus derivados semi-sintéticos estão representados na Figura 1.4 (compostos **17-21**).¹² O mecanismo de acção deste tipo de compostos não está ainda completamente definido, mas existem algumas propostas como: **i**) formação de radicais centrados nos átomos de oxigénio e carbono que interferem com a acção de inúmeras proteínas, podendo inclusive actuar como agentes alquilantes eliminando o parasita ou **ii**) inibição da proteína do retículo sarco-endoplasmático Ca^{2+} -ATPase (SERCA) codificada pelo gene *PfATP6*.⁴⁰

No sentido de combater a resistência aos fármacos existentes, vários outros alvos moleculares têm sido identificados e explorados no *Plasmodium* sp. como: **i**) proteases envolvidas na digestão da hemoglobina (plasmepsinas, falcipainas, etc.), **ii**) vias metabólicas (via de síntese de purinas e pirimidinas, etc.), biossíntese dos ácidos gordos, biossíntese do *hemo* e **iii**) vários alvos citosólicos, membranares e mitocondriais, entre outros.^{13,41,42} Além disso, a administração de fármacos combinados, que consiste na direcção dos mesmos a alvos diferentes, tem sido outra das estratégias usadas para atrasar o desenvolvimento e disseminação da resistência aos fármacos antimaláricos.⁴³

Também o desenvolvimento de fármacos duplos (moléculas híbridas) tem sido uma ferramenta utilizada na investigação de antimaláricos.^{10,34,44} Estes inibem dois alvos diferentes tentando superar a propagação da infecção, tal como evitar a resistência ao fármaco associado.

1.2.2. Resistência a antimaláricos

Uma das principais razões para a expansão global da malária são os constantes casos reportados de resistência aos fármacos antimaláricos por parte das diferentes espécies de *Plasmodium*. A resistência a fármacos tem sido um obstáculo difícil de ultrapassar na luta contra esta infecção, principalmente em três espécies: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*.^{3,45}

A resistência aos antimaláricos depende de vários processos: **i)** a taxa de mutações *de novo* que conferem resistência e são selecionadas no parasita através da utilização de fármacos num indivíduo e **ii)** a propagação de alelos resistentes de indivíduo para indivíduo. Por outro lado, **iii)** a taxa de infecção parasitária também desempenha um papel importante, pois o ciclo de vida do parasita requer um mosquito em que ocorra meiose, mas a grande maioria das divisões celulares do seu ciclo de vida ocorrem mitoticamente no hospedeiro humano, sendo nesse local, maior a probabilidade de ocorrerem mutações de resistência. Além disso, também é necessário **iv)** uma adesão ao tratamento por parte dos infectados, pois se estes não forem devidamente tratados o parasita pode desenvolver mecanismos de resistência aos fármacos fornecidos. Por último, **v)** o surgimento de parasitas resistentes a fármacos antimaláricos também pode ser acelerado por uma intensa pressão de selecção dos fármacos, diminuindo a prevalência dos parasitas não-resistentes (“wild-type”). A exposição a doses inadequadas de fármaco, fármacos com farmacocinética lenta e infecções adquiridas durante a fase de eliminação do fármaco podem resultar em parasitas expostos a concentrações não suficientes de fármaco, aumentando assim, a probabilidade de resistência aos mesmos.^{9,30}

Os primeiros casos de resistência a fármacos antimaláricos reportados aconteceram nos anos 60 e mais tarde nos anos 80, com o parasita a desenvolver resistência a fármacos de primeira linha como a cloroquina (CQ) e a sulfadoxina-pirimetamina (SP), respectivamente. Em alternativa a estes fármacos, foram desenvolvidas moléculas como a mefloquina **14**, a amodiaquina **11** e a quinina **13**, mas também já são conhecidos casos de resistência a estes fármacos.^{9,46} A artemisinina e seus derivados (**17-21**) têm sido, recentemente, fármacos muito utilizados no combate à malária, devido à elevada eficácia que têm no tratamento da infecção.⁴⁷ No entanto, têm aparecido parasitas resistentes a estes fármacos no Sudoeste Asiático e na África Subsariana.³ Na tabela 1.1, estão

representados alguns mecanismos de resistência desenvolvidos pelo parasita aos principais fármacos enumerados anteriormente, tal como o tipo de resistência que desenvolveram:

Tabela 1.1 - Principais fármacos antimaláricos usados presentemente no tratamento da malária, mecanismo e tipo de resistência que o *Plasmodium* desenvolveu.

Classe	Fármaco	Resistência	Mecanismo de Resistência
Quinolinas	Cloroquina	MDR ^a	Mutação num transportador do vácuolo do parasita (PfCRT) e no gene (pfMDR1) ⁴⁸
	Amodiaquina		
	Mefloquina	MDR ^a	Mutações ou alteração de expressão no gene pfMDR1 ⁴⁸
	Quinina		
Antifolatos	Sulfadoxina-pirimetamina	DR ^b	Mutação no gene da diidrofolato redutase (DHFR) ⁴⁷
	Atovaquona-Proguanilo	MDR ^a	Polimorfismos em nucleótidos específicos no gene do citocromo <i>b</i> ⁴⁷
Artemisininas	Artemisininas e derivados	DR ^b	Mutações no gene do transportador 6 de Ca ²⁺ ATPase (<i>pftap6</i>) e polimorfismos no gene <i>ubp1</i> ⁴⁸

Com o aparecimento de uma nova estirpe resistente à artemisinina e seus derivados continua a ser importante o desenvolvimento de novas técnicas e investimento na investigação de novos antimaláricos. A introdução de terapias combinadas com artemisinina (ACTs, do inglês – “*artemisinin-combination therapies*”) é uma das soluções implementadas, no entanto, não é o suficiente, dado que a resistência está constantemente a emergir contra os fármacos.^{9,46,49} Assim, a síntese e o desenvolvimento de novos fármacos sejam derivados de produtos naturais⁵⁰ ou não, tal como a descoberta de novos alvos terapêuticos são possíveis fontes de antimaláricos.⁴⁶

1.3. Fase hepática (FH) da malária

1.3.1. Possíveis novos alvos moleculares

A FH ou pré-eritrocítica foi, durante várias décadas, um local de actuação terapêutico pouco explorado, pois é uma fase assintomática da infecção.⁴ No entanto, dado ao aparecimento da resistência na maioria dos fármacos activos na fase sanguínea, a FH, é hoje, importante na prevenção da malária (profilaxia). O facto da fase hepática preceder a fase sanguínea, torna-a interessante por duas razões: **i)** compostos identificados como inibidores da fase hepática podem ser usados como agentes profiláticos por pessoas expostas durante um certo período de tempo, em áreas onde a malária é endémica (pex. imigrantes, refugiados), por outro lado **ii)** o aparecimento de estirpes resistentes aos fármacos é, teoricamente, menor durante a fase do fígado, pois nesta fase a taxa de parasitemia é menor do que na fase sanguínea.^{22,51,52}

A inibição total da FH do desenvolvimento do parasita, tal como já foi referido anteriormente, oferece a possibilidade de profilaxia causal. Tal facto é importante, não só pela prevenção da doença, mas também no caso em que as formas latentes de *P. vivax* e *P. ovale* tendem a ficar alojadas no fígado por longos períodos de tempo. Como em certas circunstâncias, estas formas dormentes (hipnozoítos) podem causar a recaída da infecção, uma situação de profilaxia iria prevenir o doente da infecção inicial, estando mesmo a combater a erradicação destes parasitas e consequentemente da doença.⁵¹

A sequenciação do genoma do *P. falciparum* em 2002 fez com que fossem reveladas novas informações do seu código genético, levando assim a uma visão mais alargada por parte da investigação que se impulsionou na descoberta de novos alvos terapêuticos e fármacos antimaláricos. O genoma do *P. falciparum* compreende um total de 23 MB (mega bases) e cerca de 5300 genes, fornecendo assim, um mapa alargado para a selecção e validação de novos alvos moleculares. Isto passou a ser uma prioridade no que toca à investigação sobre FH do desenvolvimento do parasita da malária.^{13,53}

Vários *screenings* baseados na descoberta de novos alvos moleculares têm sido desenvolvidos na última década. Histona desacetilase (HDAC), diidroorotato desidrogenase (DHODH), diidrofolato reductase (DHFR), chaperona 90 (Hsp90) e enzimas envolvidas na biossíntese dos ácidos gordos estão entre os alvos terapêuticos mais promissores. Embora estes estudos também proporcionem compostos que inibem o desenvolvimento da doença, a falta de especificidade entre das espécies de *Plasmodium* e as enzimas humanas têm limitado o desenvolvimento de inibidores para estes alvos.⁵¹

Bibliografia recente mostra que foram analisados os níveis de expressão transcriptómica e proteómica dos parasitas da malária em diferentes fases do ciclo de vida. Esses estudos revelam um número significativo de genes e proteínas que são expressos apenas durante a fase hepática, representado assim, possíveis alvos moleculares específicos (Figura 1.5).⁵¹

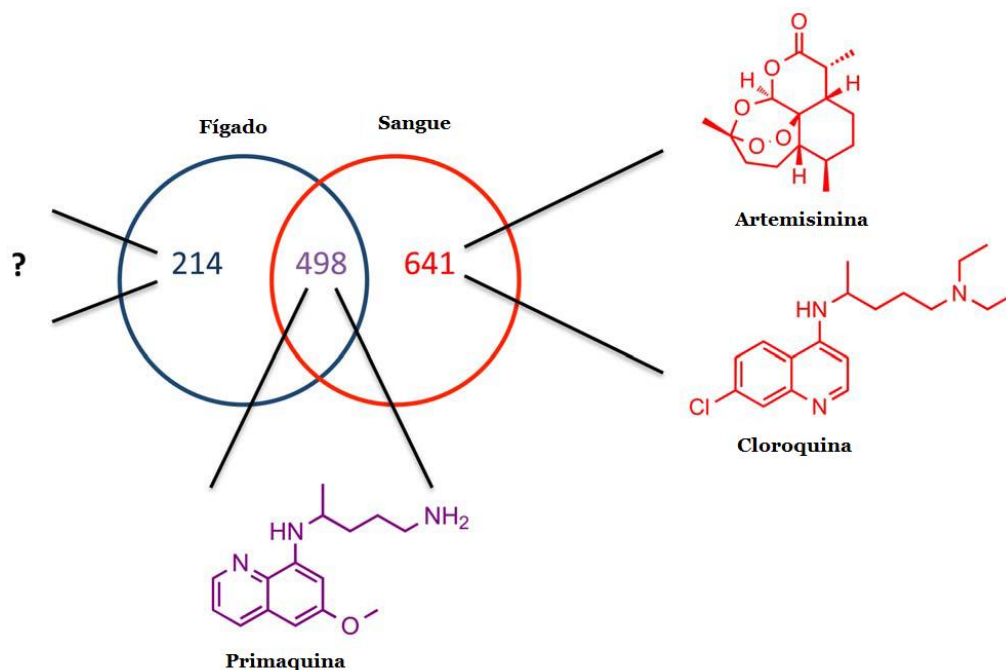


Figura 1.5 - Potenciais inibidores específicos da fase hepática. Diagrama de Venn entre proteínas da fase hepática do *P. yoelii* e proteínas da fase sanguínea do *P. berghei*. Imagem adaptada da referência 51

Entre os 214 alvos moleculares específicos presentes na FH (Figura 1.5), inclui-se proteases, proteínas envolvidas no metabolismo de oxidação-redução e proteínas envolvidas no metabolismo dos ácidos gordos, como por exemplo a via da FAS-II que é encontrada em plantas, procariotas e *Archaea*.^{13,51,52,54} O facto desta via metabólica estar ausente no hospedeiro humano torna-a num alvo molecular muito atractivo.

1.3.2. Novos compostos activos na FH

Tem sido feito um esforço extra para descobrir novos alvos moleculares na FH do desenvolvimento do *Plasmodium*, no entanto, a lista de fármacos com propriedades profiláticas ainda é muito limitada.

Entre os fármacos profiláticos disponíveis actualmente está a atovaquona **1**, a primaquina **6** e a tafenoquina **8**.⁵¹ Foi demonstrado que a atovaquona é eficiente no primeiro passo de desenvolvimento do parasita, mas a sua utilização é limitada pelo seu elevado custo económico e não actua nas formas latentes de *P. vivax* e *P. ovale*.^{51,55} Por outro lado a primaquina e a tafenoquina acarretam um elevado risco de hemólise em pacientes que têm falta de glucose-6-fosfato

desidrogenase (G6PD), sendo curiosamente nas zonas onde a malária é endémica que as pessoas mais têm falta desta enzima.⁵⁶ Tudo isto limita a utilização profilática destes fármacos. A tentativa de descoberta de novos fármacos antimaláricos com actividade para a FH têm-se intensificado nos últimos dez anos e vários compostos de diferentes classes químicas têm sido reportados na bibliografia.

Dados os problemas que as 8-aminoquinolinas usadas para fins profiláticos têm (primaquina e tafenoquina), novas moléculas têm sido reportadas como possíveis fármacos antimaláricos direccionados para a FH. A bulaquina (**24**, Figura 1.6) é um dos exemplos disso, tendo já sido aprovada na Índia, pois é mais activa e menos tóxica que a PQ, e é eficaz contra o *P. vivax*. Os estudos de relação estrutura-actividade (SAR, do inglês, structure-activity relationship) realizados mostram que os grupos 6-OMe e -2 ou 4-CH₃ melhoram a actividade, tal como a introdução de grupos alcoxilo, fluoro e fenoxilo em C5. A actividade também é favorecida por uma cadeia alquílica lateral com 4 ou 5 carbonos em C8, estando ramificada perto grupo 8-amino. Por outro lado, substituintes aromáticos em C2, bem como grupos aromáticos e alifáticos com ramificações na cadeia lateral em C8 (com aminas secundárias e terciárias terminais) diminuem consideravelmente a actividade.⁵⁷

Recentemente, foi demonstrado que o composto **25** tem melhor actividade esquizotónica que a PQ.⁵⁸ O composto **26** também foi reportado como um inibidor da FH ao contrário da molécula **27**, indicando que grupos metilo e etilo na posição C4 da quinolina prejudicam a actividade nesta fase, tal como funções bifenílicas.^{59,60} Os compostos híbridos PQ-artemisinina (**28**) também foram recentemente reportados como excelentes inibidores da FH (IC₅₀ de 155 nM).⁶¹

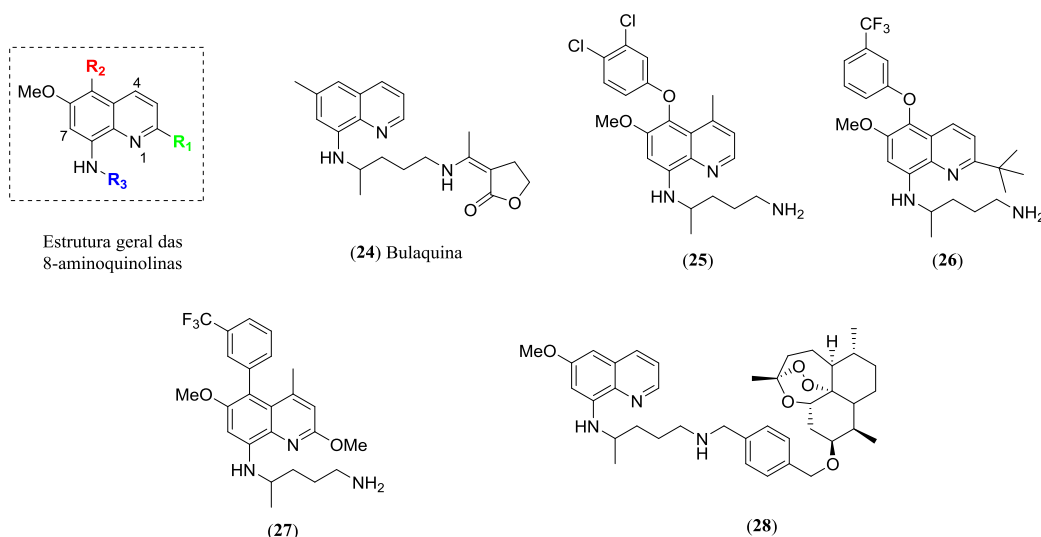


Figura 1.6 - Novas 8-aminoquinolinas reportadas como possíveis fármacos profiláticos contra a malária.

Os alcaloides são produtos naturais que têm um excelente ponto de partida na descoberta de vários fármacos. As moléculas **29-33** (Figura 1.7) foram isoladas de extractos da casca de

Strychnopsis thouarsii e exibiram uma actividade selectiva contra a FH do *P. yoelii*. Os compostos **29** e **30** apresentaram um IC_{50} de 3,1 e 4,5 μ M, respectivamente, enquanto que o **31** foi 5 vezes menos activo que o **29**. O composto **32** foi inactivo devido ao impedimento estéreo (β -glucosido) e o **33** apresentou uma actividade semelhante ao **29**, no entanto, menos tóxico. É de realçar que a presença do grupo hidroxilo livre com estereoquímica (R) aumenta a actividade destas moléculas.^{62,63}

A atovaquona é uma naftoquinona e, como já foi dito, tem sido usada como fármaco antimalárico profilático que inibe o complexo *bc*₁ do parasita colapsando a membrana mitocondrial. No entanto, devido às suas desvantagens (elevado custo e risco de recaída) outras naftoquinonas têm sido reportadas. Os compostos **34-37** (Figura 1.7) apresentam um IC_{50} de 96,2; 17,07; 246,5 e 4451,8 nM, respectivamente contra um IC_{50} de 19,7 nM da atovaquona na FH do *P. berghei*. O estudo de SAR indica que o grupo metilo em R₁ prejudica a actividade e o grupo CF₃ melhora a estabilidade metabólica.⁶⁴

As 4-(1*H*)-quinolonas e a licochalcona A são outros exemplos de inibidores da cadeia de transporte de electrões da mitocôndria. A 4-(1*H*)-quinolona **38** foi activa *in vitro*, contra o *P. yoelii* com um IC_{50} de 177 pM.⁶⁵ Outras 4-(1*H*)-quinolonas (**39** e **40**), também demonstram, recentemente, actividade *in vitro* contra o *P. berghei* com IC_{50} de 3,07 e 0,08 nM, respectivamente.⁶⁶ Um *screening* virtual molecular encontrou um composto bastante activo, a licochalcona A **41**, com um IC_{50} de 0,927 nM contra o *P. yoelii* (PQ IC_{50} = 75,7 nM).^{67,68} As quinolin-4(1*H*)-iminas foram desenvolvidas, inicialmente, com o intuito de inibir o complexo *bc*₁ (compostos activos **42** e **43**, Figura 1.7). No entanto, o estudo revelou não ser esse o mecanismo de acção, sendo um grupo de compostos activos em ambas as fases da infecção com IC_{50} na gama dos nM.^{69,70}

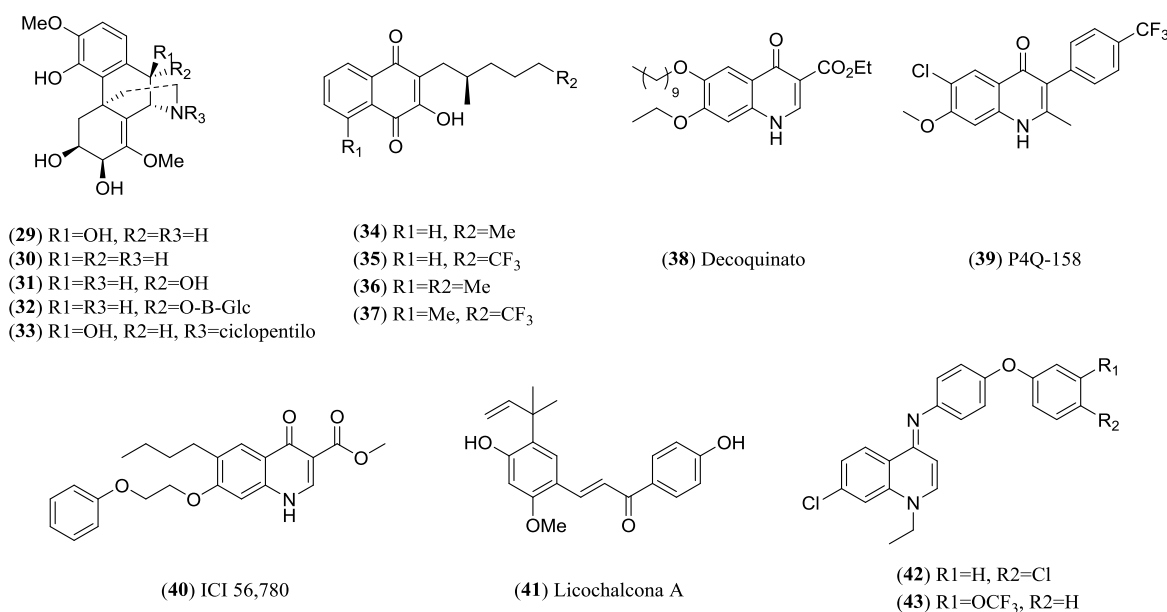


Figura 1.7 - Outras estruturas reportadas como possíveis fármacos profiláticos contra a malária.

A FAS-II têm vindo a ser reportada como essencial apenas durante a FH do ciclo de vida do *plasmodium*.^{13,51,52,54} Assim, na Figura 1.8 estão representados alguns inibidores desta enzima reportados na bibliografia com actividade contra a fase hepática do parasita. Compostos como o triclosan (**44**, $IC_{50} = 6,8 \mu M$)⁷¹ e derivados do hexaclorofeno (**45**, $IC_{50} = 4-7 \mu M$)⁷² apresentaram actividade contra a FH do *P. berghei*. Uma nova geração de bifosfonatos também mostrou actividade e um elevado índice de selectividade (> 100 , em relação à citotoxicidade para hepatócitos humanos) contra a FH. Os compostos **46-50** apresentaram actividades na gama dos 8-10 μM .⁷³ Metabolitos secundários de líquens foram também testados contra o *Plasmodium* e alguns deles mostraram ser potenciais inibidores da FAS-II (ácido evérnico **51**, ácido vúlpico **52**, ácido psorómico **53** e (+)-ácido úsnico **54**), com o ácido úsnico a ser o metabolito mais activo contra a FH, sendo quatro vezes mais potente que a PQ.⁷⁴ Recentemente, foram reportados inibidores da FAS-II como antimaláricos para ambas as fases da infecção. Os compostos **55** e **56** exibiram um IC_{50} a uma concentração de 10 μM , de 2,79 e 3,14 μM , respectivamente.⁷⁵

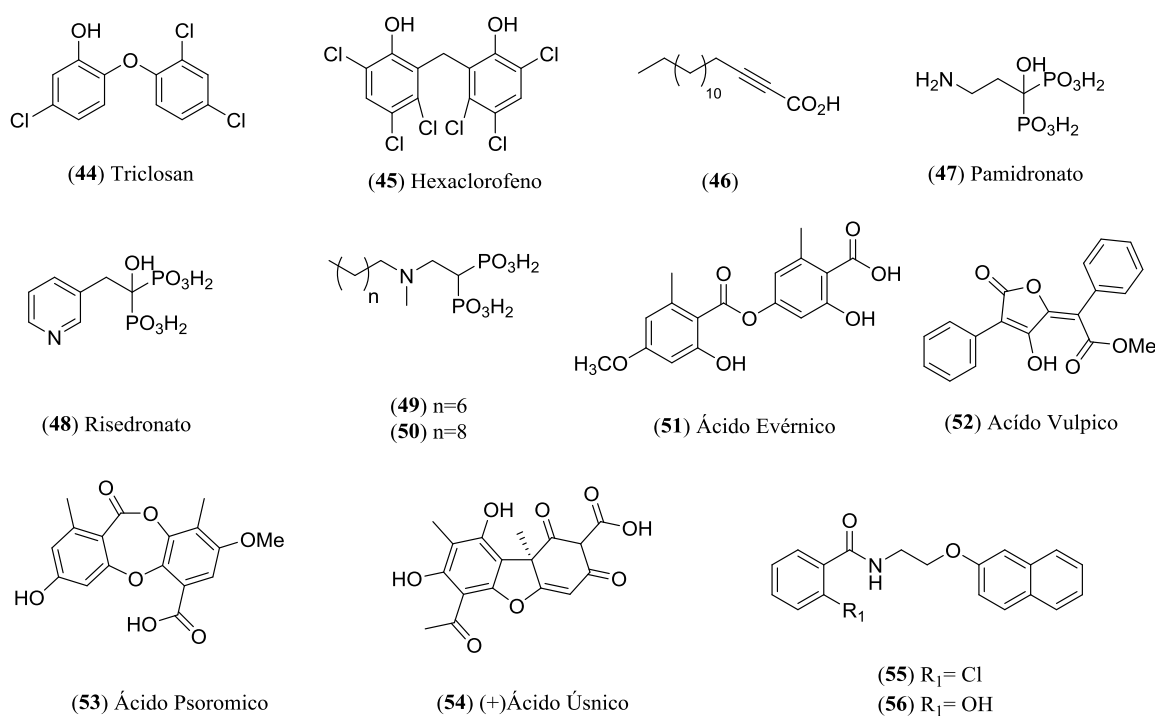


Figura 1.8 - Inibidores da FAS-II.

Outros exemplos têm sido publicados como inibidores da FH do parasita (Figura 1.9). Ionóforos que intercalam em organelos membranares e facilitam a troca transmembranar de iões metálicos como o K^+ e Na^+ (**57** e **58**, respectivamente) apresentaram uma actividade antiplasmódica na ordem dos nano e picomolar.⁷⁶⁻⁷⁸ Inibidores das proteases do VIH também demonstraram actividade contra a fase hepática do *P. berghei* (**59**, $IC_{50} = 80 \text{ nM}$).⁷⁹ A flavona **60** ($IC_{50} = 3,88 \mu M$) tem actividade antiplasmódica contra o *P. berghei* e foi sintetizada como sendo um isómero

das 4-(1*H*)-quinolonas com o objectivo de inibir o complexo *bc*₁.⁸⁰ Derivados do cinamoilo, foram também, recentemente reportados como potentes antimaláricos activos em ambas as fases da infecção. O cinamoilo **61** mostrou uma actividade antiplasmódica na FH com um IC₅₀ = 3,2 µM.⁸¹ Os derivados do cinamoilo **62-65**, apresentaram um IC₅₀ na FH de 2,86; 1,13; 1,42; 1,44 respectivamente, indicando que a função cinamoilo é essencial para a actividade hepática e grupos electrodadores em *para* diminuem a actividade.⁸² A delavirdina⁸³ (**66**, IC₅₀ = 0,846 nM), o mibefradilo⁸³ (**67**, IC₅₀ = 0,873 nM), a dobutamina⁸³ (**68**, IC₅₀ = 3,7 nM), a halofuginona⁸⁴ (**69**, IC₅₀ = 17 nM) e um derivado primaceno⁸⁵ (**70**, IC₅₀ = 170 nM) são outros exemplos de compostos publicados com elevada actividade contra a FH do parasita *P. berghei* (alguns deles altamente selectivos) e apresentam, na sua generalidade, mais actividade que a PQ⁵² (IC₅₀ = 7,5 µM, *P.berghei*).

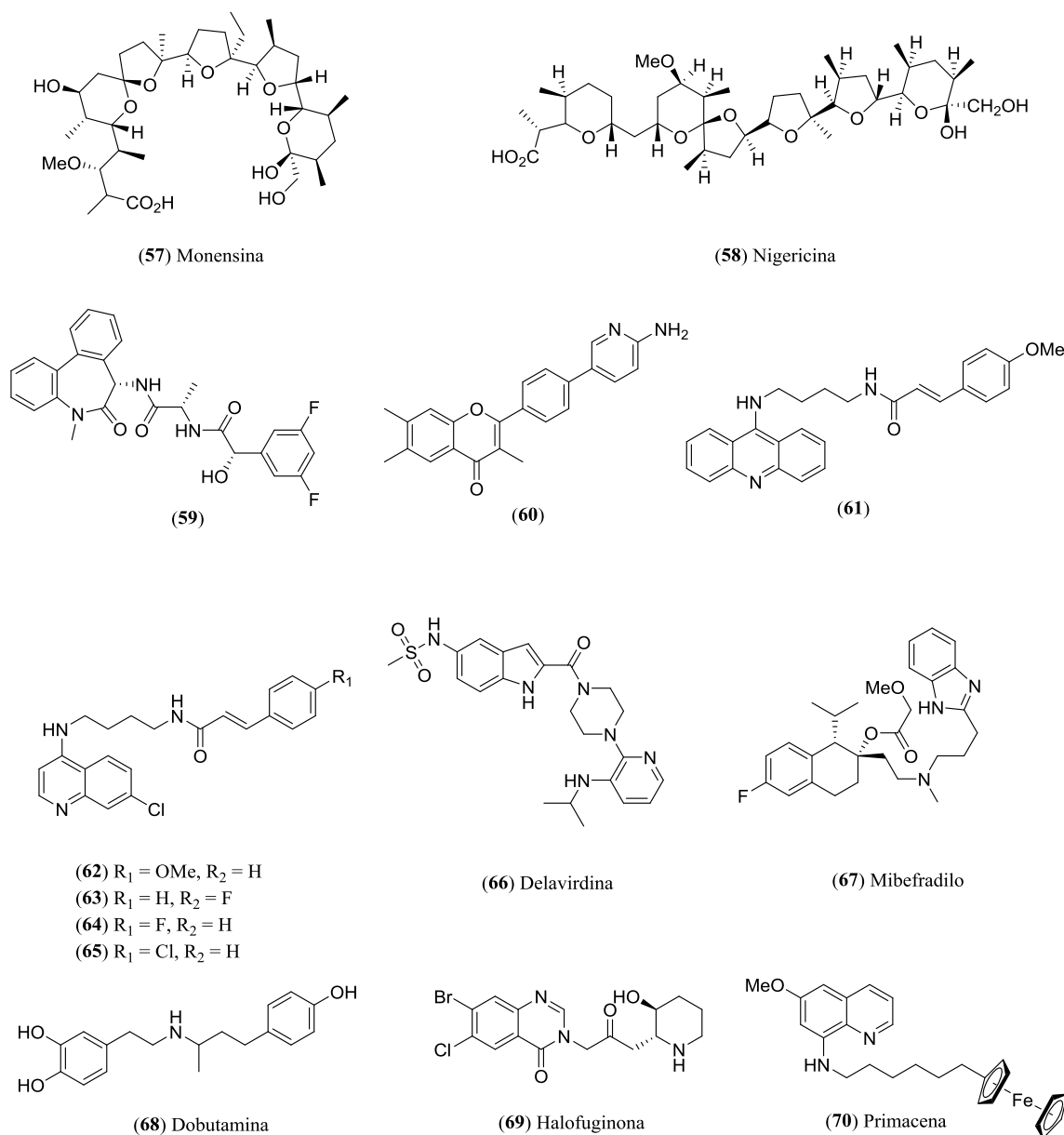


Figura 1.9 - Outros compostos activos na fase hepática do *Plasmodium*.

1.3.3. Desenvolvimento/estratégias de pesquisa de novas moléculas

Não há dúvida que é necessário a descoberta de novos e eficientes fármacos contra esta infecção. Assim, a química medicinal têm realizado constantes esforços na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.⁴⁴

A abordagem moderna para o desenvolvimento de novos compostos activos contra doenças infecciosas complexas, especialmente as globalizadas, tais como a malária, baseia-se, muitas vezes, na utilização de alvos moleculares terapêuticos definidos. Nesta abordagem, a investigação utiliza recursos que permitem:

- A busca e identificação de compostos com mecanismos moleculares definidos contra um alvo específico (por exemplo, fases do ciclo de vida do *Plasmodium*) - *screening* de bibliotecas de compostos.^{3,86}
- *Design* de novas moléculas (a partir de moléculas conhecidas com actividade antimalárica ou actividade para outras doenças, como por exemplo, produtos naturais ou outros fármacos).
- A análise de um grande número de compostos com um custo/benefício favorável.
- O desenvolvimento de compostos com a toxicidade selectiva.

A pesquisa ou *screening* de compostos bioactivos já conhecidos é outro dos métodos mais utilizados no desenvolvimento e optimização de novos fármacos antimaláricos. Isto é importante porque a terapia usada para o tratamento da malária tem mostrado ser segura e a sua eficácia provada ao longo dos anos é uma estratégia atractiva do ponto de vista económico, farmacêutico e clínico.⁸⁷ Um exemplo de *screening* no desenvolvimento de novas estruturas é a triagem fenotípica de alta eficiência (“*phenotypic HTS*”), em que os esforços se centram na exploração de uma classe de estruturas específicas, a fim de encontrar compostos que apresentem actividade contra uma fase do ciclo de vida do parasita em vez de produzir, desde o início, uma estrutura altamente específica para um dado alvo molecular. Nos últimos anos, foram identificados através deste método, vários compostos activos na fase hepática, o que os torna bastante atractivos devido ao possível uso profilático (Figura 1.10). Os compostos **71-73** da família das imidazolopiperazinas foram descobertos através de um *screening* que revelou actividade antimalárica para ambas as fases da infecção. Relativamente à FH, os compostos **71-73** foram activos contra as FEE do *P. yoelii* com um $IC_{50} = 1,9; 121$ e $4,5$ nM, respectivamente.⁸⁸ Actividade antiplasmódica contra a FH do *P. berghei* também foi descoberta, através de um HTS, nos compostos **74-79** com $IC_{50} = 680; 291; 224; 47; 25; 356$, respectivamente.⁷⁶ A actividade promissora contra a FH do decoquinato **38** e da monensina **57** também está reportada em *screenings*.^{76,89}

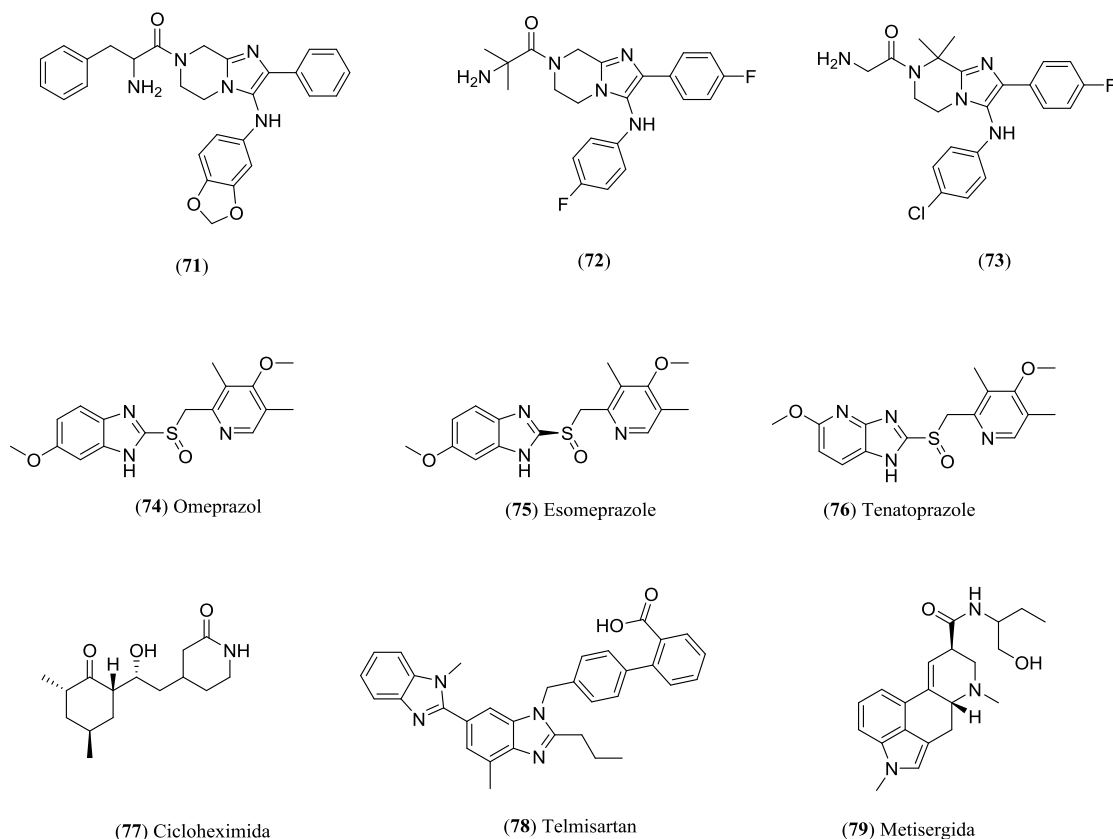


Figura 1.10. Compostos saídos de *screenings* com actividade na FH.

1.3.4. Quinazolininas

As quinazolininas e seus derivados são compostos químicos *N*-heterocíclicos formados pela fusão de dois anéis aromáticos simples, um anel de benzeno e uma pirimidina. O seu esqueleto quinazolinínico é amplamente encontrado em alcaloides e diversos compostos biologicamente activos.^{90,91} A quinazolinina (**80**, Figura 1.11) foi isolada pela primeira vez a partir de uma planta chinesa, *Dichroa febrifuga* Lour. O desenvolvimento da pesquisa em relação à actividade biológica de derivados da quinazolinina iniciou-se quando foi sintetizado o primeiro análogo desta família (2-metil-3-aryl-4-quinazolinona **81**), que apresentou acção sedativa e soporífica.⁹⁰

Devido às suas distintas actividades farmacológicas, nos últimos 10-20 anos, esta estrutura tem vindo a ser amplamente explorada tendo sido já determinadas diversas actividades biológicas de derivados da quinazolinina, que incluem actividade anti-inflamatória, anti-bactericida, analgésica, anti-viral, anti-citotoxina, anti-hipertensa, anti-obesidade, anti-psicótica, anti-convulsante, anti-tubercular, etc.^{90,92}

Em particular, as 4-aminoquinazolininas têm vindo a ser interessantes do ponto de vista das suas propriedades farmacológicas. Alguns fármacos representados na Figura 1.11, como o gefitinib **82**, o erlotinib **83** e o vandetabin **84**, derivados das 4-aminoquinazolininas foram aprovados pelo FDA para o tratamento de vários tipos de cancro como inibidores da tirosina cinase, que actua no receptor

do factor de crescimento epidermal (EGFR, do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*). A prazosina **85** actua nos receptores α_1 adrenérgicos, bloqueando-os e exercendo a sua acção vasoconstritora. A alfuzosina **86** e a buzosina **87** são antagonistas dos receptores α_1 e responsáveis pelo tratamento da hiperplasia prostática.⁹⁰

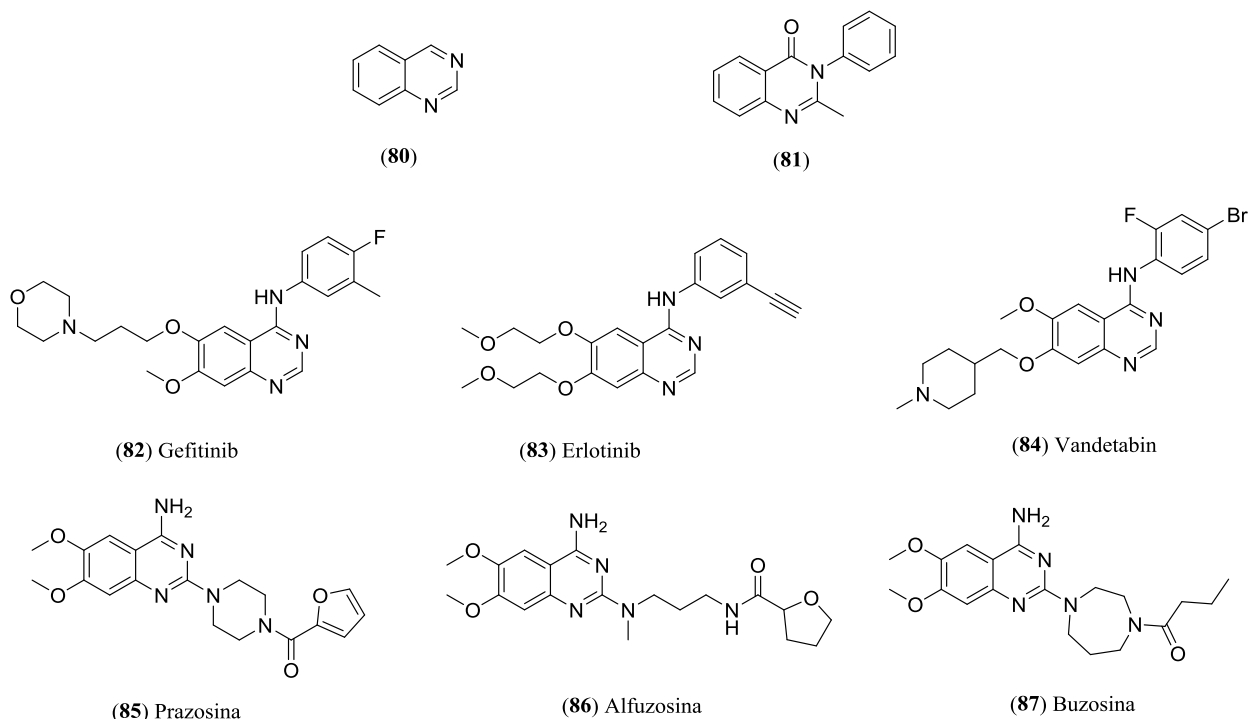


Figura 1.11. Exemplos de quinazolinas e seus derivados de 4-aminoquinazolina.

Apesar das inúmeras aplicações biológicas a que têm sido associados, alguns derivados da quinazolina têm sido, também, considerados como potenciais antimaláricos semelhantes aos derivados da quinolina mas menos tóxicos. Na Figura 1.12. a quinazolina **88** mostrou potencial *in vitro* contra o *P. falciparum* 3D7 e *in vivo* contra o *P. yoelii nigeriensis*.⁹³ Por outro lado, as quinazolinas **89** e **90** demonstraram actividade antiplasmódica contra a fase sanguínea do *P. falciparum* W2 com $IC_{50} = 0,95$ e $0,4 \mu M$, respectivamente (CQ, $IC_{50} = 0,4 \mu M$).^{94,95} A quinazolona **91** é um derivado promissor do produto natural febrifugina que apresentou actividade antiplasmódica contra a estirpe W2 do *P. falciparum* ($IC_{50} = 0,55 nM$) e actividade *in vivo* contra a FH ($ED_{50} = 0,39 mg/kg$).⁹⁶ O composto **92** é um análogo de quinazolina baseado nos antimaláricos amodiaquina e isoquina que apresenta actividades promissoras contra a fase sanguínea do *P. falciparum* D10 e W2 ($IC_{50} = 53$ e $67 nM$, respectivamente).⁹⁷ Num dos *screening* fenotípico contra a fase hepática do parasita *Plasmodium* desenvolvidos para identificar sistematicamente moléculas com eficácia para esta fase, foi testada uma biblioteca de 5375 compostos bioactivos conhecidos (contendo 640 fármacos aprovados pelo FDA). Foram identificados 37 capazes de inibir a fase hepática do *P. berghei* com um IC_{50} inferior a $10 \mu M$.⁷⁶ Entre os 37 compostos capazes de inibir a fase hepática do parasita estava uma 4-aminoquinazolina

(**93**, Figura 1.12) com um IC_{50} na gama dos nM e que está reportada como inibidora da activação do factor nuclear κB (nF- κB , do inglês, *nuclear factor kappaB*).⁹⁸

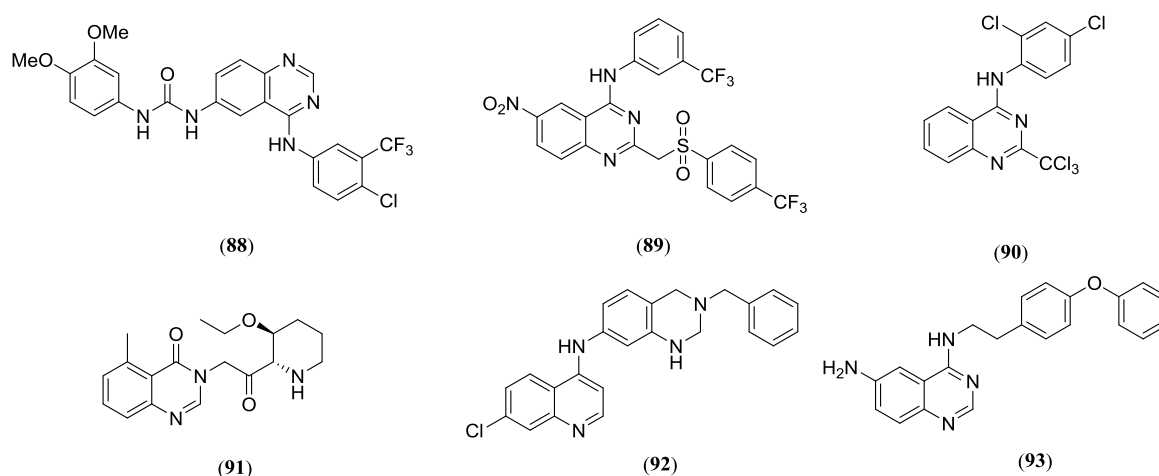


Figura 1.12 - Quinazolinas reportadas na literatura com actividade antimalária. A 4-aminoquinazolina **93** resultou do HTS fenotípico com actividade antiplasmódica selectiva contra a FH do parasita (12 nM, *P. berghei*).⁷⁶

O papel principal do nF- κB é controlar a expressão de genes imunitários e inflamatórios (mais especificamente, controlo da transcrição do ADN) envolvidos em certas doenças (por exemplo, psoríase, asma e arterites reumatóides), o que faz dele, tanto essencial, como promissor agente molecular terapêutico.⁹⁸ No caso da 4-aminoquinazolina **93**, que foi estudada neste trabalho, revelou ser atraente pela sua elevada actividade e selectividade para a fase hepática (em relação à fase sanguínea) do *P. berghei*, baixa toxicidade⁷⁶ e síntese simples baseada em precursores acessíveis. Apesar do composto **93** estar descrito como inibidor da activação do nF- κB , não foi encontrado nenhum homólogo para este alvo no parasita, sugerindo que este pode não ser sítio onde a 4-aminoquinazolina **93** actua.⁷⁶ Assim, é importante ter certezas relativas ao mecanismo de acção da molécula para saber onde farmacologicamente e em que alvo molecular terapêutico se está a actuar. Para isso, é necessário o desenvolvimento de ferramentas químicas adequadas para o estudo do mecanismo de acção, a nível molecular, destes compostos. Um exemplo dessas ferramentas é o uso da química de click na síntese de sondas moleculares fluorescentes, que, acopladas ao fármaco em estudo, podem fornecer mais informações sobre o alvo onde ele actua.

1.4. A química de “click” – Reacções Biortogonais na descoberta de mecanismos de acção de novas moléculas

Das diversas formas de reter mais informação sobre onde actua uma nova molécula (alvo molecular terapêutico) e o seu modo de actuação estão referenciadas técnicas de marcação por afinidade fotoquímica (“*photoaffinity labeling*”) e sondas fluorescentes (por exemplo, “*turn-on probes*”). Estas técnicas são representadas por moléculas orgânicas que, através de reacções biortogonais, dentro de sistemas vivos, interagem com o próprio sistema, actuando no alvo para que a molécula em estudo tem mais afinidade.

1.4.1. As reacções Biortogonais

A química biortogonal refere-se a qualquer reacção química que pode ocorrer dentro de um sistema biológico vivo sem interferir com os seus processos bioquímicos naturais.^{99,100} Os grupos funcionais que nelas participam devem ser inertes às biomoléculas do sistema biológico e selectivos para a reacção sob condições biocompatíveis.

Com as limitações das abordagens convencionais na marcação de biomoléculas *in vivo* a tornarem-se cada vez mais frequentes, começou-se a pensar se as biomoléculas alvo poderiam ser tratadas quimicamente num contexto biológico, de tal forma que as sondas de marcação formassem ligações covalentes selectivas a estas biomoléculas alvo.^{101,102} Assim, o conceito de biortogonalidade foi implementado pela primeira vez por *Bertozzi et al.* em 2003 onde experimentaram uma reacção biortogonal para marcar glicanos.¹⁰³ Recentemente, uma série de reacções químicas, que são ortogonais para os grupos funcionais presentes nos sistemas biológicos, têm vindo a revolucionar o campo da química de “Click” através da sua selectividade, por exemplo, na marcação de alvos biológicos dentro de sistemas biológicos complexos.^{104,105}

A química de “click” tem por princípio utilizar moléculas orgânicas que sejam obtidas a partir de um grupo de reacções altamente eficazes (reacções biortogonais) e que apresentam características específicas, como por exemplo, ocorrerem rapidamente com elevados rendimentos, sob condições ambientais não-ideais, obtendo apenas um produto. Estas reacções, nas condições ideais, são estereoespecíficas, quimioselectivas e, são estáveis em meios aquosos, ou seja, compatíveis com meios fisiológicos. Assim, as reacções que satisfaçam os requisitos da química de “click” são eficazes para a marcação selectiva de biomoléculas, pois devido ao seu rendimento elevado sob condições biológicas e, sendo os seus produtos, precursores biortogonais, não reagem com grupos funcionais de moléculas biológicas indesejadas. Por exemplo, se o objectivo for marcar uma proteína para saber onde se localiza dentro da célula, dada a complexidade do sistema biológico, a reacção teria que ser ortogonal. Além disso, a reacção deve ocorrer a pH neutro ou

próximo do neutro, a temperaturas entre os 25-37° C e sem quaisquer reagentes citotóxicos ou subprodutos.^{101,102,106}

No caso da marcação de biomoléculas em sistemas *in vivo* via reacção biortogonal, este processo segue duas etapas (Figura 1.13): **i)** o composto activo (por exemplo: inibidor de uma enzima, ligando de uma molécula ou um substrato de uma via metabólica) é funcionalizado a um dos grupos (*repórter* químico) intervenientes na reacção biortogonal e é colocado no sistema biológico; **ii)** reacção química biortogonal com uma sonda fluorescente apropriada e funcionalizada com o segundo *repórter* químico. A reacção biortogonal entre os dois grupos funcionais (inertes ao sistema biológico) não pode ser tóxica e a sua cinética deve ser rápida de modo a que o produto seja formado a uma velocidade ideal (mesmo quando as concentrações dos reagentes são muito pequenas).^{105,106}

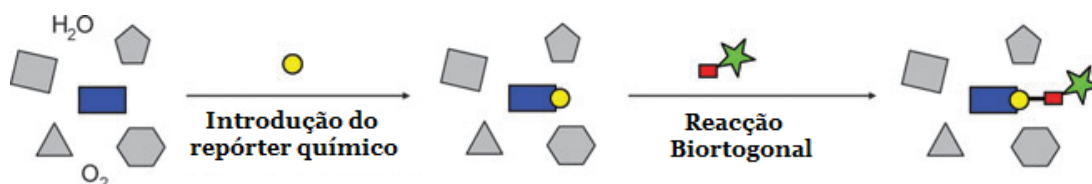
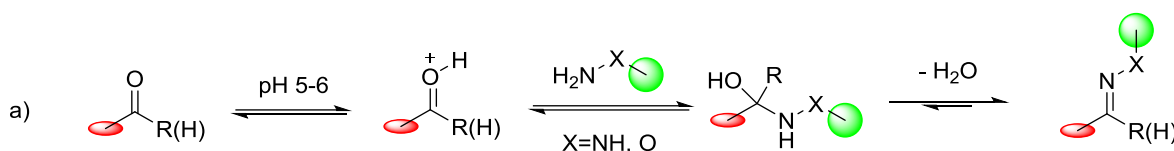


Figura 1.13 - Representação esquemática da química biortogonal na marcação de biomoléculas. O rectângulo azul representa o alvo molecular, o círculo amarelo o *repórter* químico, o rectângulo vermelho o segundo grupo funcional e a estrela verde representa a sonda fluorescente. Imagem adaptada da referência 105

Até à data, existem diversas reacções biortogonais eficazes no uso da marcação de biomoléculas, e que serão discutidas mais pormenorizadamente nas secções seguintes.

1.4.1.1. Condensação entre aldeídos/cetonas e nucleófilos amínicos

A cetona e o aldeído são grupos funcionais atractivos como *repórteres* químicos biortogonais. Isto porque são facilmente acoplados às biomoléculas dentro de um sistema biológico complexo devido ao seu pequeno tamanho e são quimicamente inertes na presença de grupos funcionais endógenos em condições fisiológicas. Neste tipo de condensações, em condições acídicas ligeiramente (pH = 5~6), o grupo amina ataca o carbonilo protonado formando um base de Schiff reversível, sendo o equilíbrio favorecido à forma livre do carbonilo. No entanto, se forem usadas aminas reactivas como hidrazidas e alcoxiaminas, o equilíbrio favorece a formação da imina devido ao efeito α , gerando aductos estáveis de hidrazona e oxima, respectivamente (Esquema 1.1). É de realçar que os nucleófilos biológicos (aminas, tióis, álcoois, etc.) também reagem com cetonas e aldeídos, no entanto, o equilíbrio em meio aquoso favorece a formação do carbonilo livre.^{106,107}



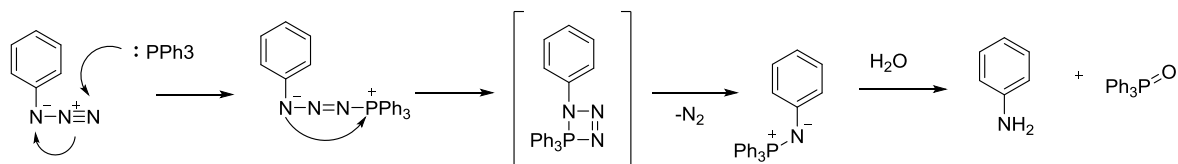
Esquema 1.1 - Representação geral da catálise ácida da condensação de aldeídos ou cetonas com nucleófilos de amina. O círculo vermelho representa o alvo molecular e a verde a sonda fluorescente.

Um dos primeiros estudos realizados com este tipo de condensação ocorreu em 1986 por *Rideout et al.*¹⁰⁸, onde se fez reagir um aldeído com a hidrazida dentro de células vivas. Neste estudo, eritrócitos humanos foram expostos a uma mistura de decanal e *N*-amino-*N'*-octilguanidina (AOG) a 28 μM cada em PBS a 37 °C. A constante cinética de pseudo-primeira-ordem entre o decanal e a AOG variou entre os $5,6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $9,8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ dependendo do meio da reacção. Mais tarde, outro estudo foi realizado por *Bertozzi et al.*¹⁰⁹, que demonstrou a capacidade desta condensação biortogonal à superfície celular. Uma cetona foi utilizada como *repórter* químico que reagiu com a hidrazida, obtendo uma constante de ligação aos resíduos de ácido siálico da superfície celular de $k_{\text{lig}} = 0,033 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Comparando com os resultados cinéticos do estudo anterior, esta reacção biortogonal é melhor em aplicações extracelulares, isto porque: **i)** aldeídos e cetonas estão ausentes da superfície celular; **ii)** a reacção requer um pH óptimo de 5-6, o que não acontece no meio intracelular; **iii)** a presença de electrófilos endógenos como o piruvato e o oxaloacetato pode interferir com a reacção; **iv)** altas concentrações de reagente (2-5 mM) são necessárias para compensar a cinética lenta deste tipo de reacções.^{102,106}

Na generalidade, este tipo de reacções biortogonais não são as mais indicadas na marcação de biomoléculas intracelulares, pois apresentam cinéticas lentas e limitações relativamente ao pH (pH 5-6).^{102,106,107}

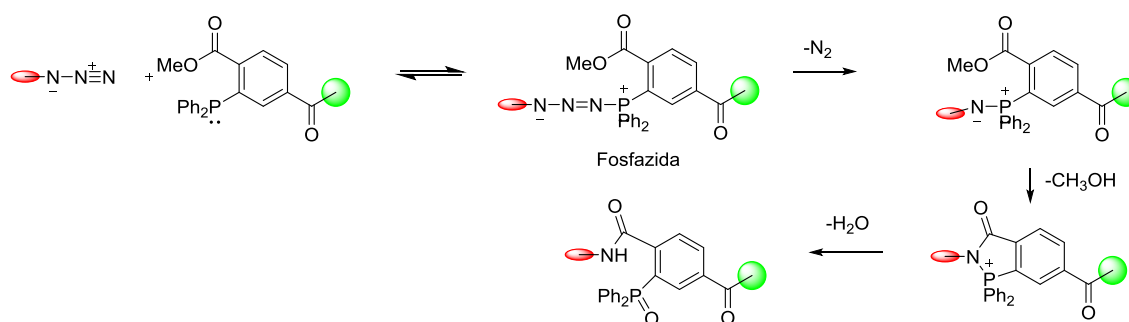
1.4.1.2. Ligação Staudinger entre azidas e fosfinas

A reacção de *Staudinger* é uma das reacções clássicas da química orgânica onde está presente o grupo azida. Este grupo é interessante do ponto de vista ortogonal porque não está presente em biomoléculas, é estável em condições fisiológicas e, à semelhança da condensação anterior, esta reacção também é constituída por moléculas pequenas, tornando-se numa vantagem ao serem incorporadas dentro da célula.^{101,102}



Esquema 1.2 - Mecanismo geral da reacção de *Staudinger*.

Nesta reacção o grupo azida é transformado numa amina primária após interacção com uma fosfina (Esquema 1.2). A reacção começa com o ataque nucleófilico da fosfina ao azoto terminal electrófilico da azida formando um intermediário de fosfazida que rapidamente perde N_2 para dar origem a um azo-ileto que na presença de água, hidrolisa espontaneamente, formando então, a amina primária. No entanto, esta reacção não é considerada biortogonal porque a hidrólise quebra a ligação covalente no azo-ileto. Assim, Bertozzi *et al.*¹⁰⁷ desenvolveram uma fosfina que tem um grupo éster em posição orto em relação ao átomo de fósforo no anel aromático. Isto tem o objectivo de conter a reactividade do azo-ileto, pois este reage com o éster electrófilico através de uma ciclização intramolecular para formar um anel de cinco membros e, finalmente, após uma hidrólise forma-se uma ligação amida estável – ligação de *Staudinger* (Esquema 1.3).



Esquema 1.3 - Representação esquemática da ligação de *Staudinger*.

Uma análise cinética desta ligação entre a trifetilfosfina e a benzil-azida em CD_3CN (5% H_2O) revelou uma constante de segunda ordem à volta dos $0,0025\ M^{-1}s^{-1}$. Estas constantes cinéticas baixas são uma desvantagem na marcação intracelular de alvos moleculares.¹⁰⁶

1.4.1.3. Reacções entre azidas e alcinos

As azidas também podem participar em reacções de cicloadição [3+2] 1,3-dipolo com alcenos e alcinos. A primeira foi reportada por Rolf Huisgen nos anos 60¹¹⁰ que introduziu o conceito de cicloadição 1,3-dipolar, mas as altas temperaturas e pressões requeridas para favorecer a cicloadição e obter triazóis não são compatíveis com sistemas biológicos. Mais tarde, de forma a contornar essas desvantagens, foi descoberta a reacção entre azidas e alcinos para obtenção de triazóis, catalisada por sais de Cu (I) – (CuAAC, do inglês *copper-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition*).^{101,102,106} Nesta reacção, a formação do acetileto de cobre activa o alcino para reagir com a azida, sendo 7 vezes mais rápida que a reacção não catalisada por cobre e 25 vezes mais rápida que a ligação *Staudinger*. Apesar disto, a necessidade do catalisador de cobre é

uma desvantagem, pois este é tóxico para as células mesmo a baixas concentrações (as células morrem com 1 mM de sal de Cu(I)).¹¹¹

Têm sido desenvolvidas uma série de reacções com o objectivo de contornar a toxicidade causada pelo cobre. Entre elas está a reacção entre a azida e o ciclooctino (SPAAC, do inglês *strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*). A cinética das SPAAC (dependendo do tipo de ciclooctinos) é particularmente rápida devido à tensão formada pelo ângulo da ligação tripla e a tensão presente no anel do ciclooctino. A constante cinética de segunda ordem para a cicloadição entre o ciclooctino e a benzil-azida em CD₃CN (5% H₂O) é 0,0012 M⁻¹s⁻¹, sendo mais baixa que a ligação de *Staudinger* e a CuAAC. Apesar disso, foram desenvolvidos derivados do ciclooctino (Figura 1.14) que apresentaram cinéticas ainda mais promissoras no contexto das reacções biortogonais – Tabela 1.2.¹¹²

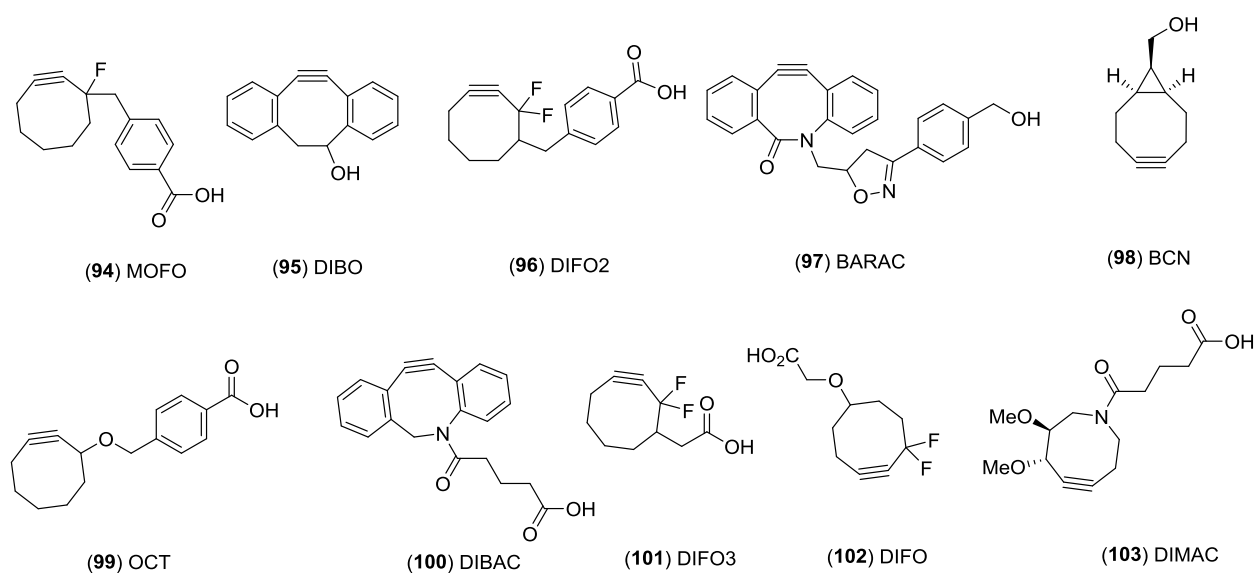


Figura 1.14 - Alguns derivados do ciclooctino desenvolvidos para SPAAC.

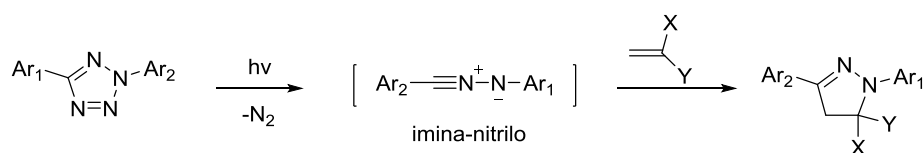
Tabela 1.2 - Reactividade dos ciclooctinos funcionalizados representados na Figura 1.14. ¹¹¹

Molécula	k ($\times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Solvente
(94) MOFO	4,3	CD ₃ CN
(95) DIBO	120	CD ₃ CN:D ₂ O (3:1)
(96) DIFO2	42	CD ₃ CN
(97) BARAC	960	CD ₃ CN
(98) OCT	2,4	CD ₃ CN
(99) DIBAC	310	CD ₃ OD
(100) DIFO3	52	CD ₃ CN
(101) DIFO	76	CD ₃ CN
(102) BCN	140	CD ₃ CN:D ₂ O (3:1)
(103) DIMAC	3	CD ₃ CN

1.4.1.4. Reacções entre tetrazóis e alcenos

Uma das características que as reacções biortogonais também devem ter é rápida inducibilidade. Ao estudar este processo dinâmico, seria vantajoso se se pudesse controlar o início de uma reacção biortogonal no espaço e no tempo, aplicando uma perturbação cinética no sistema biológico. Para isso, têm sido desenvolvidas reacções biortogonais fotoinduzidas (*“photoclick chemistry”*) que fornece no tempo ferramentas químicas para o estudo de processos biológicos.¹⁰⁶

Tal como exemplificado no Esquema 1.4, este tipo de reacções é baseado num mecanismo concertado do diariltetrazole induzido por foto-radiação libertando N₂. Isto forma uma imina-nitrilo *in situ* que depois cicliza espontaneamente com um alceno gerando o ciclo-aducto de pirazolina. Estudos posteriores desta reacção demonstraram que esta cicloadição induzida fotoquimicamente pode ser empregue para modificar proteínas que contenham tetrazóis na sua estrutura. Um estudo cinético entre um péptido contendo um tetrazole e a acrilamida em PBS a pH 7,5, demonstrou que por fotoradiação o intermediário imina-nitrilo formou-se rapidamente ($k_1 = 0,14 \text{ s}^{-1}$) e que a cicloadição seguinte com a acrilamida deu-se com uma constante de segunda ordem de $11 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.¹¹³ Uma cinética muito mais rápida que a da ligação de *Staudinger* e a SPAAC.¹⁰⁶



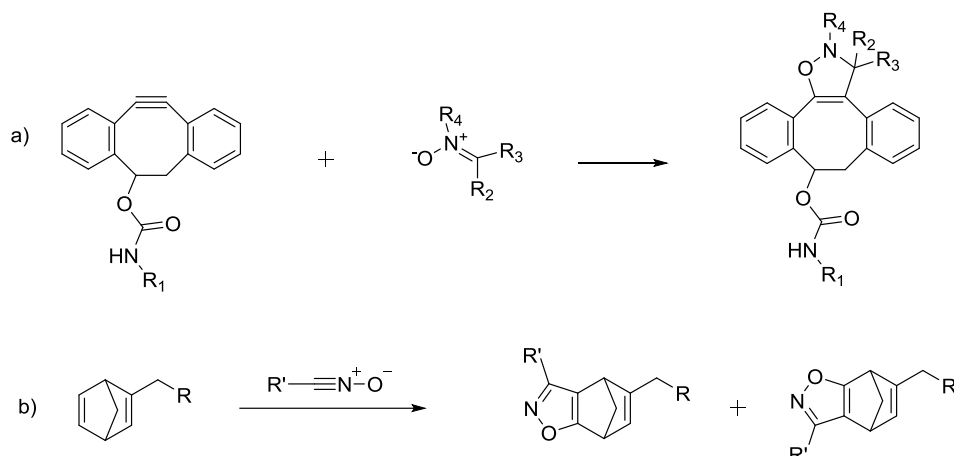
Esquema 1.4 - Esquema geral da cicloadição 1,3-dipolar fotoinduzida entre alcenos e tetrazóis.

Comparando com os outros tipos de reacções biortogonais, esta apresenta duas vantagens que é a formação de luz devido à formação de aductos fluorescentes (não é necessário fluoróforo) e o fácil acesso a reagentes de tetrazole.

1.4.1.5. Outras reacções biortogonais com alcenos e alcinos

Recentemente foram reportadas outras reacções biortogonais envolvendo alcenos ou alcinos. A cicloadição entre a nitrona e um derivado do ciclooctino (Esquema 1.5a) forma isoxazolininas *N*-alquiladas e é usada, por exemplo, na modificação de péptidos. A reacção é extremamente rápida em meio aquoso apresentando constantes de segunda ordem entre os 12 e os $32 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, dependendo da substituição na nitrona.¹¹⁴

No Esquema 1.5b, está representada outro tipo de reacção entre o norborneno e o óxido de nitrilo. É uma cicloadição em que o norborneno actua como dipolarófilo dando à reacção elevada reactividade e estabilidade. No entanto a cinética desta reacção é muito lenta.¹¹⁵



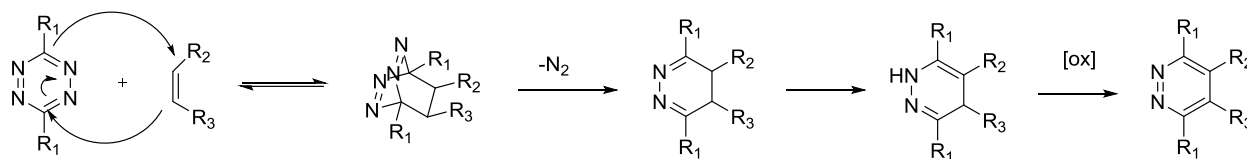
Esquema 1.5 - a) Esquema geral da cicloadição 1,3-dipolar entre um derivado do ciclooctino e a nitrona. b) cicloadição do norborneno.

1.4.2 Ligações de tetrazina

A tetrazina é uma molécula que consiste num anel aromático de seis membros contendo quatro átomos de azoto. A sua síntese tem vindo a ser reportada desde o século XIX, sendo a mais comum a reacção equimolar entre a hidrazina e um benzonitrilo, com posterior oxidação. As tetrazinas e seus derivados reagem rapidamente com uma série de compostos insaturados através de uma cicloadição Diels-Alder [4+2] que forma um intermediário não observável e, posteriormente através de um passo irreversível de Diels-Alder inversa (iEDDA, do inglês, *inverse-electron-demand Diels-Alder*) liberta uma mole de N_2 dando origem ao produto final.^{116,117}

A cicloadição de Diels-Alder é uma transformação altamente selectiva e mais rápida em meio aquoso do que em solventes orgânicos devido ao efeito hidrofóbico. Este tipo de cicloadição têm vindo a ser vastamente utilizada em reacções de bioconjugação, nomeadamente na marcação de biomoléculas funcionalizadas com o *trans*-cicloocteno (TCO), que reagem depois com tetrazinas adicionadas ao meio.^{102,106,116-120}

Mecanicamente (Esquema 1.6.), a tetrazina reage com o dienófilo através de uma cicloadição [4+2] formando um aducto que rapidamente se forma na correspondente 4,5-dihidropiridazina através de uma iEDDA, libertando uma mole de azoto. De seguida, dá-se uma isomerização 1,3-prototrópica que forma o isómero final. Na iEDDA a HOMO do dienófilo reage com a LUMO do dieno, ou seja, a orbital π^* do dieno que é deficiente em electrões (tetrazina) sobrepõe-se com a orbital π ocupada mais energética do dienófilo.^{116,117}



Esquema 1.6 - Esquema geral de uma reacção de iEDDA entre uma tetrazina e um alceno com libertação de azoto molecular e posterior oxidação.

A reacção de iEDDA nas ligações da tetrazina com compostos insaturados pode ser seguida espectroscopicamente observando o desaparecimento de uma banda bem visível entre os 510 e 550 nm e apresenta duas grandes vantagens para a marcação de biomoléculas, comparativamente com as reacções biortogonais enumeradas anteriormente: **i)** não necessita de catalisadores metálicos (tóxico para as células) e **ii)** as cinéticas desta reacção são claramente superiores a todas as outras reacções biortogonais (Tabela 1.3.).^{116,121}

Tabela 1.3 - Reactividade de derivados da tetrazina com alcenos em diferentes condições.

Tipo de Reacção	k ($M^{-1}s^{-1}$)	Condições
3,6-di(2-piridilo)-tetrazina+TCO	2000	MeOH:H ₂ O (9:1)
Tetrazina+norborneno	1,9	PBS aq.
Tetrazina+TCO	6000	PBS aq.
	12700	Dioxano
Tetrazina+Oxanobornadieno	0,00087	PBS aq.
Tetrazina+Cis-cicloocteno	0,03	Dioxano

Como se pôde perceber, as limitações cinéticas das reacções biortogonais têm sido uma preocupação geral. Tal facto, fez com que fossem exploradas outro tipo de reacções como é o exemplo da iEDDA que ao reagir rapidamente pode ser facilmente utilizada em condições biológicas na presença de grupos funcionais biológicos. Devido à sua cinética rápida, a ligação de tetrazina pode ser bastante útil nos casos em que reacções rápidas são necessárias para localizar biomoléculas pouco abundantes.

1.4.3 “Turn-On Probe” – fluoróforo BODIPY-FL

Para o seguimento em tempo real da marcação de biomoléculas em sistemas biológicos vivos, a construção de uma sonda fluorescente tem pré-requisitos muitos específicos. A sua síntese deve ser livre de catalisadores metálicos, a sua cinética de acoplamento deve ser rápida e tem que ter um fluoróforo.¹²⁰

Um fluoróforo é um composto químico fluorescente que tem na sua estrutura grupos aromáticos ou partes planas ou cíclicas com várias ligações π . A sua característica particular é a fluorescência, onde a molécula absorve energia a um comprimento de onda específico e posteriormente emitirá essa energia noutro comprimento de onda maior (menor energia).¹²² O processo de fluorescência inicia-se quando uma molécula, no estado fundamental (S_0), absorve a energia de um fóton, o que faz com que os electrões se desloquem para orbitais de maior energia, passando para o estado excitado (S_1). O electrão pode voltar ao estado fundamental, havendo libertação da energia em excesso, com emissão de fótons (por exemplo, fluorescência) ou de maneira não-radiactiva.¹²³

Quando se escolhe um fluoróforo para fazer parte de uma sonda fluorescente a introduzir num sistema biológico, existem vários aspectos a ter em conta, nomeadamente: a absorção máxima (λ_{max}) e a emissão máxima (λ_{em}), que representam o pico máximo no espectro de absorção e emissão, respectivamente. O comprimento de onda da λ_{em} é maior que o λ_{max} , devido à perda de energia na reorganização do solvente ou outros processos. A diferença entre o λ_{em} e o λ_{max} é designado de desvio de Stokes. Outro parâmetro importante num fluoróforo é o coeficiente de extinção molar (ϵ), que correlaciona a quantidade de luz absorvida, num dado comprimento de onda, com a concentração do fluoróforo em solução.¹²⁴

Fluoróforos com pequenos valores de desvios de Stokes são susceptíveis de se autoextinguirem (*quenching*) por transferência de energia, o que limita o número de espécies que se podem acoplar à biomolécula. O tempo em que a molécula está no estado excitado (τ) e a razão dos fótons de fluorescência com os absorvidos (ϕ) são parâmetros essenciais num fluoróforo, pois são importantes na comparação de diferentes moléculas fluorescentes. O brilho de um fluoróforo ($\epsilon \times \phi$) inclui a quantidade de luz absorvida e a razão da eficiência do fluoróforo e, portanto, na comparação de diferentes sondas estes dados devem ser considerados. Na Figura 1.15. estão representados alguns dos fluoróforos mais usados.¹²⁴

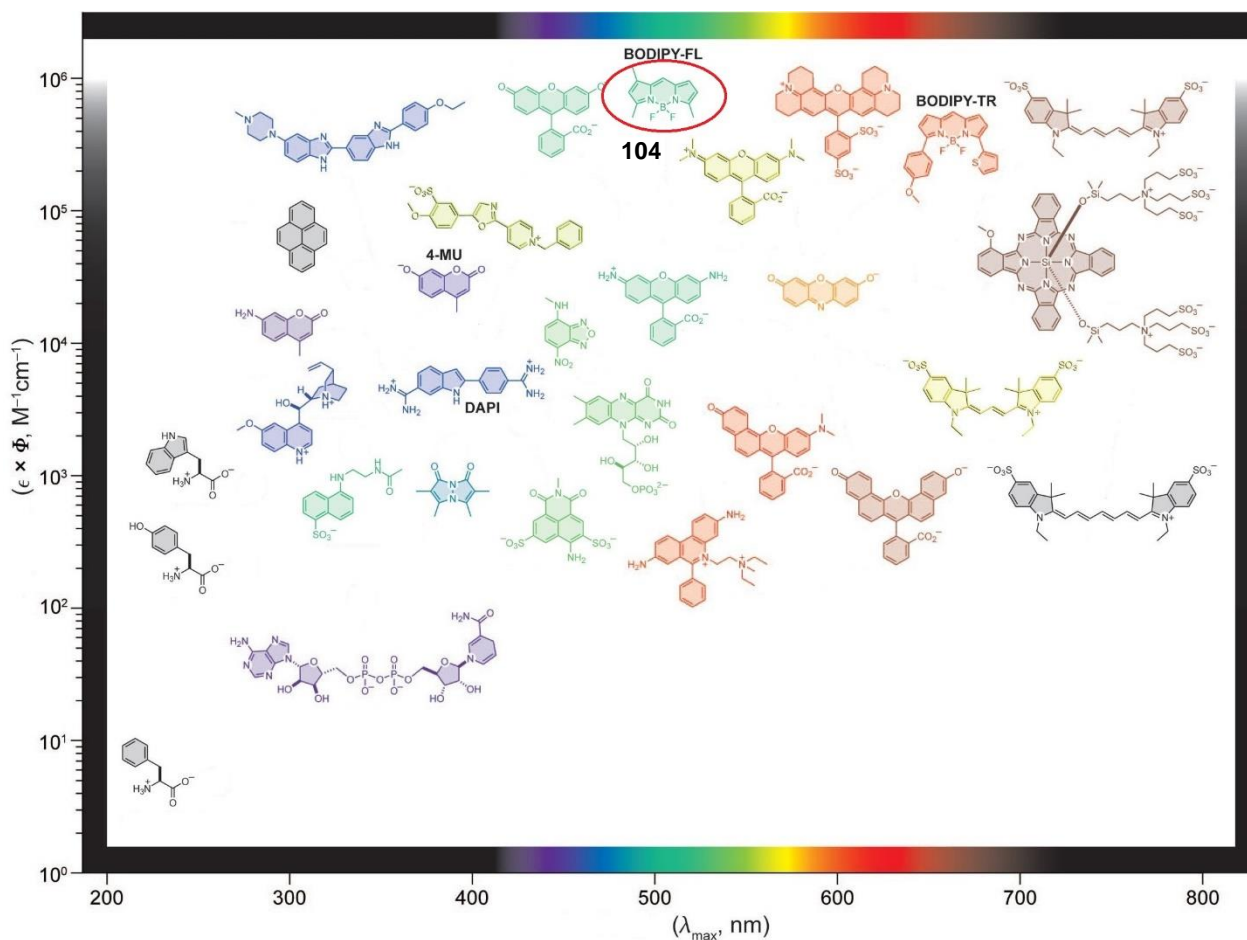


Figura 1.15 - Fluoróforos mais comuns. No eixo horizontal está representado o comprimento de onda máximo de absorção e no eixo vertical está o brilho. Circundado a vermelho está o fluoróforo sintetizado neste trabalho. Imagem adaptada da referência 123

Recentemente, o BODIPY-FL (**104**), representado na figura, têm sido reportado como um dos fluoróforos mais promissores e utilizados na marcação de biomoléculas no interior de sistemas biológicos.¹²⁴ As suas características neutras e lipofílicas revelam vantagens para esta aplicação, em relação a outros fluoróforos. O BODIPY-FL é um composto tricíclico fluoro-borado com características espectroscópicas particulares, tais como: **i)** apresenta um pequeno desvio de Stokes; **ii)** tem uma λ_{max} de 505 nm e λ_{em} de 512 nm; **iii)** um $\epsilon = 9,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e **iv)** um ϕ de 0,94 em meio aquoso (meio fisiológico).

Relativamente à sonda, o BODIPY-FL, ao reagir com a tetrazina (*quencher*) o seu rendimento quantitativo (ϕ) cai, diminuindo assim, a sua fluorescência inicial. No entanto, após reacção biortogonal com o TCO (constantes cinéticas elvadas) é recuperada a fluorescência da sonda (daí o nome, “*turn-on*” *probe*). Este tipo de sondas têm vindo a ser reportadas como métodos inovadores no seguimento de processos bioquímicos intracelulares, pois não necessitam de catalisadores metálicos na sua estrutura (menor toxicidade), apresentam cinéticas de reacção rápidas, permitindo

uma imagiologia eficiente e resolução temporal rápida e é altamente fluorescente, o que maximiza o sinal da imagem e minimiza o sinal de fundo em aplicações *in vivo*.¹²⁰

1.4.4 Biomarcação por afinidade fotoquímica (“*photoaffinity labeling*”)

A marcação de biomoléculas por foto-afinidade é outra técnica que acoplada à química de “click”/biortogonal fornece informação sobre o alvo molecular terapêutico onde o composto em estudo actua num dado sistema biológico.¹²⁵

O princípio desta técnica baseia-se na derivatização de um grupo fotoreactivo (GFR) que ao ser irradiado com luz UV pode formar uma ligação reversível ou irreversível com o alvo biológico. A irradiação fotoquímica é responsável pela formação de um intermediário altamente reactivo (por exemplo, nitreno, carbeno ou diradical) que forma uma ligação covalente entre o alvo molecular e a sonda fotoquímica (Figura 1.16). Na sua generalidade, os GFR usados nesta técnica costumam ser azidas aromáticas, alifáticas, diazirinas aromáticas e benzofenonas. As azidas aromáticas, têm um máximo de absorção < 300 nm o que poderia resultar num dano celular após a fotoirradiação, ao contrário das diazirinas que absorvem entre 350-380 nm e as benzofenonas entre 350-360 nm, o que não é numa desvantagem para as células.¹²⁵

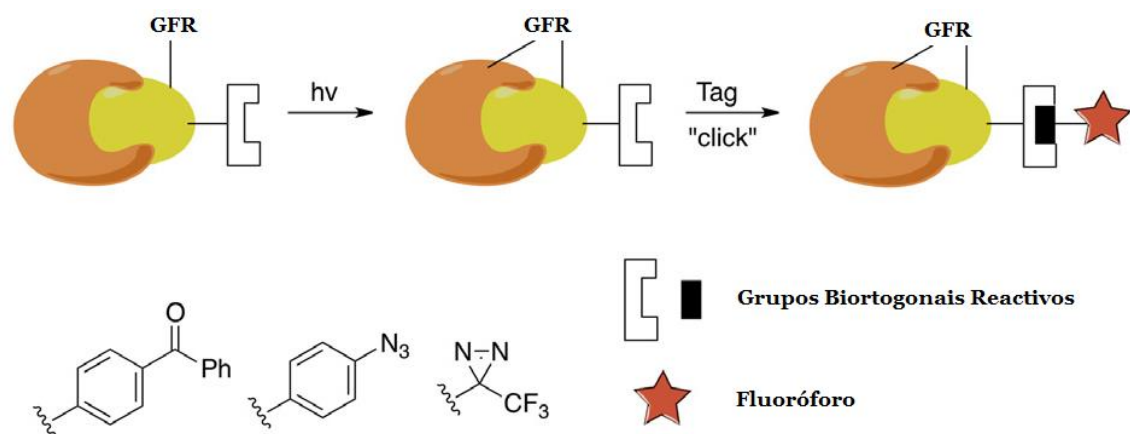
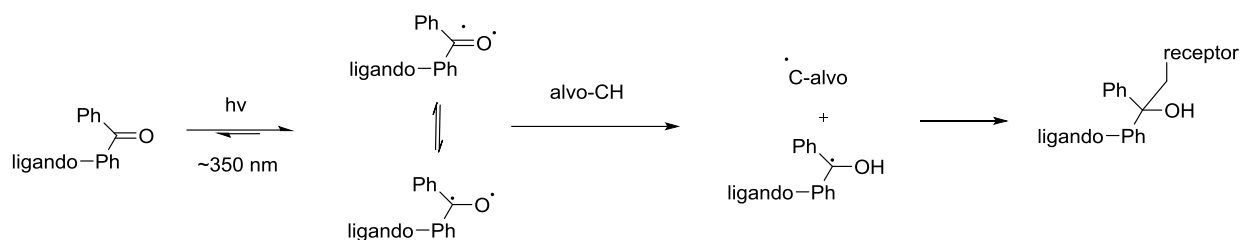


Figura 1.16 - Representação de uma bioconjugação por afinidade fotoquímica. O alvo (laranja) reage com o GFT a amarelo (pex. benzofenona, azida ou diazirina, respectivamente) que pode, ou não, ser ajudado por um *repórter* químico e um fluoróforo via biortogonal. Imagem adaptada da referência 124

Os carbenos são os GFR mais reactivos e as benzofenonas são usadas frequentemente nesta técnica devido à sua elevada estabilidade química, disponibilidade comercial e propriedades fotoquímicas. Elas reagem com ligações CH inactivas mesmo na presença de água. Uma característica importante destas moléculas é que a formação de dirradicais reversíveis aumenta a

eficiência de marcação do alvo molecular devido aos vários ciclos de excitação-relaxação – Esquema 1.7.¹²⁵⁻¹²⁷



Esquema 1.7. Fotólise da benzofenona com o ligando e posterior interação com o alvo molecular. 126

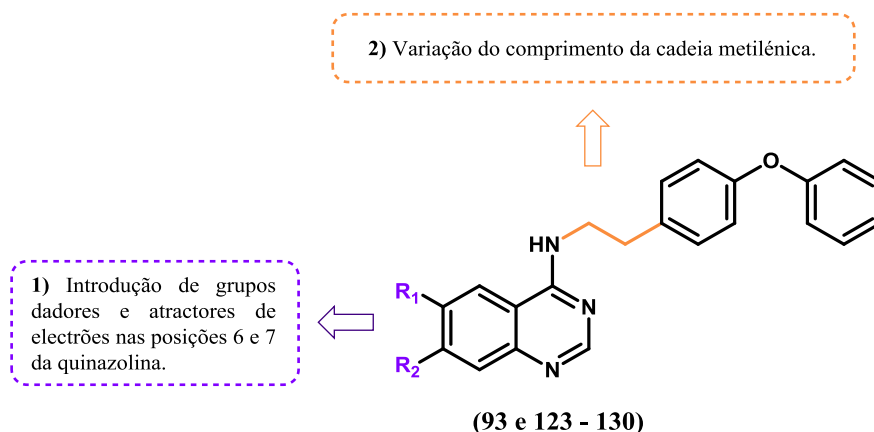
Tal como as sondas fluorescentes, estas espécies de sondas fotoquímicas também requerem certas características: **i)** uma sonda fotoquímica deve ser inerte ao conteúdo intracelular; **ii)** deve ser activada em condições suaves; **iii)** a sua activação não deve danificar a célula; **iv)** o tempo de vida do estado excitado do marcador deve ser mais curto que o tempo de vida do complexo ligando-receptor; **v)** a sonda fotoquímica deve ser inespecífica para outros grupos vizinhos dentro da célula. Uma sonda fotoquímica com todos estes critérios seria a ideal para identificar o alvo terapêutico de novos fármacos.¹²⁵⁻¹²⁷

1.5 Objectivos

Sendo a malária uma doença infecciosa que mata milhares de pessoas ano após ano, existe uma necessidade urgente no que respeita ao desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos.^{44,52} A erradicação da malária necessita de novas abordagens terapêuticas que visem desenvolver novas moléculas no combate à rápida e contínua emergência de resistência aos fármacos já conhecidos.¹²⁸ A FH da infecção por malária oferece vantagens importantes, por exemplo, para estratégias de erradicação profiláticas. No entanto, nos dias de hoje, a fraca diversidade química entre os inibidores potentes com selectividade para a FH é muito grande.^{52,129}

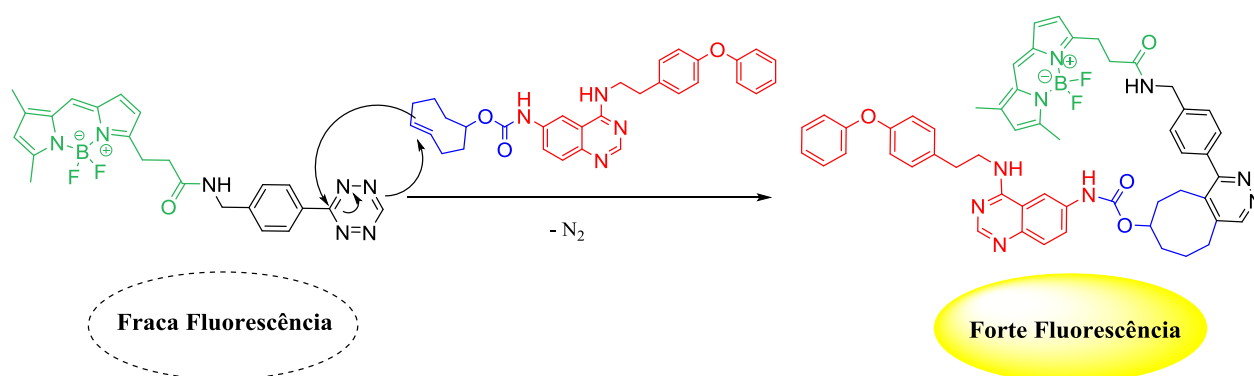
Numa tentativa de lidar com a falta de quimiotipos, foi sido desenvolvido um *high throughput screening* fenotípico da FH do parasita *Plasmodium berghei* para identificar sistematicamente moléculas com eficácia para esta fase da infecção. No âmbito do “*Harvard Medical School – Portugal Program*”, foi realizado um *screening* de uma biblioteca de 5375 compostos bioactivos conhecidos, contendo 640 fármacos aprovados pela FDA. Tal *screening* levou à identificação de 37 hits, ou seja, inibidores da FH da malária com um IC_{50} inferior a 10 μM . Das 37 moléculas identificadas, foi seleccionado o composto **93**, um derivado da quinazolina, que está descrito como inibidor da activação do factor nuclear kappaB ($nF-\kappa B$). Este composto foi o escolhido para estudar as suas propriedades farmacológicas na FH da doença devido a vários factores: **i)** o *screening* revelou um valor de IC_{50} de 12 nM para a FH, **ii)** elevada selectividade para a FH da doença (IC_{50} de 1,17 μM para a fase sanguínea)⁷⁶, **iii)** revelou baixa citotoxicidade em hepatócitos humanos (IC_{50} = 59 μM em HepG2)⁷⁶, **iv)** vias de síntese acessíveis de modo a estudar as propriedades da molécula, realizando um estudo de SAR para futura optimização do composto. Assim, o maior desafio deste trabalho foi estudar novas quinazolininas como inibidores selectivos da FH e desenvolver ferramentas químicas adequadas para determinar o seu modo de actuação no organismo.

Dados estes factos, o primeiro objectivo desta tese foi estudar o ambiente químico à volta da função quinazolina com o intuito de obter um estudo de relação estrutura-actividade (SAR) útil para uma futura optimização do composto. Para isso, foram estudadas várias vias sintéticas susceptíveis de proporcionar uma grande diversidade química, a fim de obter inibidores para a FH, bem como determinar a sua actividade biológica para completar o estudo de SAR. As alterações a realizar no composto **93** estão resumidas no Esquema 1.8:



Esquema 1.8 - Alterações a efectuar na molécula identificada pelo *screening* para o estudo de SAR.

Apesar de se saber que este tipo de derivados da quinazolina são bastante activos para a FH, o seu mecanismo de acção não é ainda conhecido. Assim, o segundo objectivo deste trabalho, foi tentar desenvolver uma ferramenta química que possa ser usada para desvendar mais informação sobre o mecanismo de acção desta nova classe de antimaláricos, através da síntese de uma sonda baseada na fluorescência (“*turn-on probe*”) para actuar a nível intracelular. O estudo do mecanismo de acção a nível molecular requer o uso de reacções bioortogonais, ou seja, reacções químicas que não interagem nem interferem com o sistema bioquímico das células.^{102,120} A síntese de todas as funções químicas da sonda (fluoróforo BODIPY-FL, TCO, tetrazina e quinazolina) foi o grande desafio para a aplicação final de uma reacção biortogonal intracelular. Esta reacção biortogonal ocorre através de uma cicloadição *tetrazina/trans-cicloocteno*, que envolve uma reacção de Diels-Alder inversa com libertação de azoto molecular^{112,116} - Esquema 1.9.



Esquema 1.9 - Representação mecanística da reacção de cicloadição Diels-Alder inversa entre a *tetrazina/trans-cicloocteno*. A azul está representada a função TCO, a vermelho o fármaco em estudo (quinazolina), a preto a molécula de tetrazina e a verde o fluoróforo BODIPY-FL.

Capítulo 2

Síntese e Caracterização dos novos compostos de quinazolina

2.1 Síntese dos derivados de Quinazolina

Ao invés da fase sanguínea, a fase hepática da doença sempre foi pouco explorada, o que faz com que a terapia existente para esta fase da doença ainda seja muito pouco desenvolvida. Dos fármacos actualmente disponíveis, a atovaquona **1**, a primaquina **6** e a tafenoquina **8** são alguns dos fármacos profiláticos mais conhecidos, mas a propagação da resistência a estes fármacos tal como o elevado custo de alguns deles, faz com que a descoberta e o desenvolvimento de novas moléculas selectivas para a FH seja extremamente atraente.⁵¹

Tal como já foi dito anteriormente, o objectivo deste trabalho experimental foi o desenvolvimento de novos compostos activos e selectivos para a FH do parasita da malária, contendo como função química principal a porção de quinazolina. Analisando a estrutura **93**, que foi eleita de um conjunto de outras estruturas derivadas de um HTS fenotípico⁷⁶ no âmbito do “*Harvard Medical School – Portugal Program*” (ver capítulo 1.5), contam um grupo funcional amina na posição 6 da função quinazolina. Decidiu-se então, estudar a actividade deste tipo de compostos sem esta mesma função amina, mas também com a introdução de grupos dadores (grupo metoxilo) e atractores (bromo e cloro) de electrões nas posições 6 e 7 da função quinazolina. Outro foco de estudo consistiu em determinar qual a importância do tamanho da cadeia alquílica da amina lateral (posição 4) para a actividade biológica. Como o composto fornecido pelo *screening*, tem dois carbonos, neste trabalho sintetizou-se e determinou-se a actividade biológica de derivados com aminas laterais sem carbonos ou com um carbono na cadeia metilénica. A retrosíntese geral deste tipo de compostos está representada na Figura 2.1a e mostra ser necessário chegar aos derivados da 4-cloroquinazolina para posteriormente as aminas reagirem com esses mesmos derivados. A obtenção das moléculas finais foi realizada através da introdução de uma amina primária na posição 4 da porção de quinazolina recorrendo a uma reacção de substituição nucleofílica aromática (S_NAr). Devido ao preço acessível dos reagentes e à eficiência dos passos sintéticos, a síntese destes intermediários quinazolínicos, partindo do ácido antranílico correspondente (análise retrosintética – Figura 2.1b), foi efectuada com base num estudo reportado na literatura por Masanori *et al.*^{98,130} Por outro lado, na Figura 2.1c está representada a retrosíntese das aminas primárias intermediárias com diferente número de carbonos na cadeia alquílica que reagem com as 4-cloroquinazolinas correspondentes. As vias sintéticas adoptadas e a identificação estrutural dos compostos sintetizados serão discutidas neste capítulo.

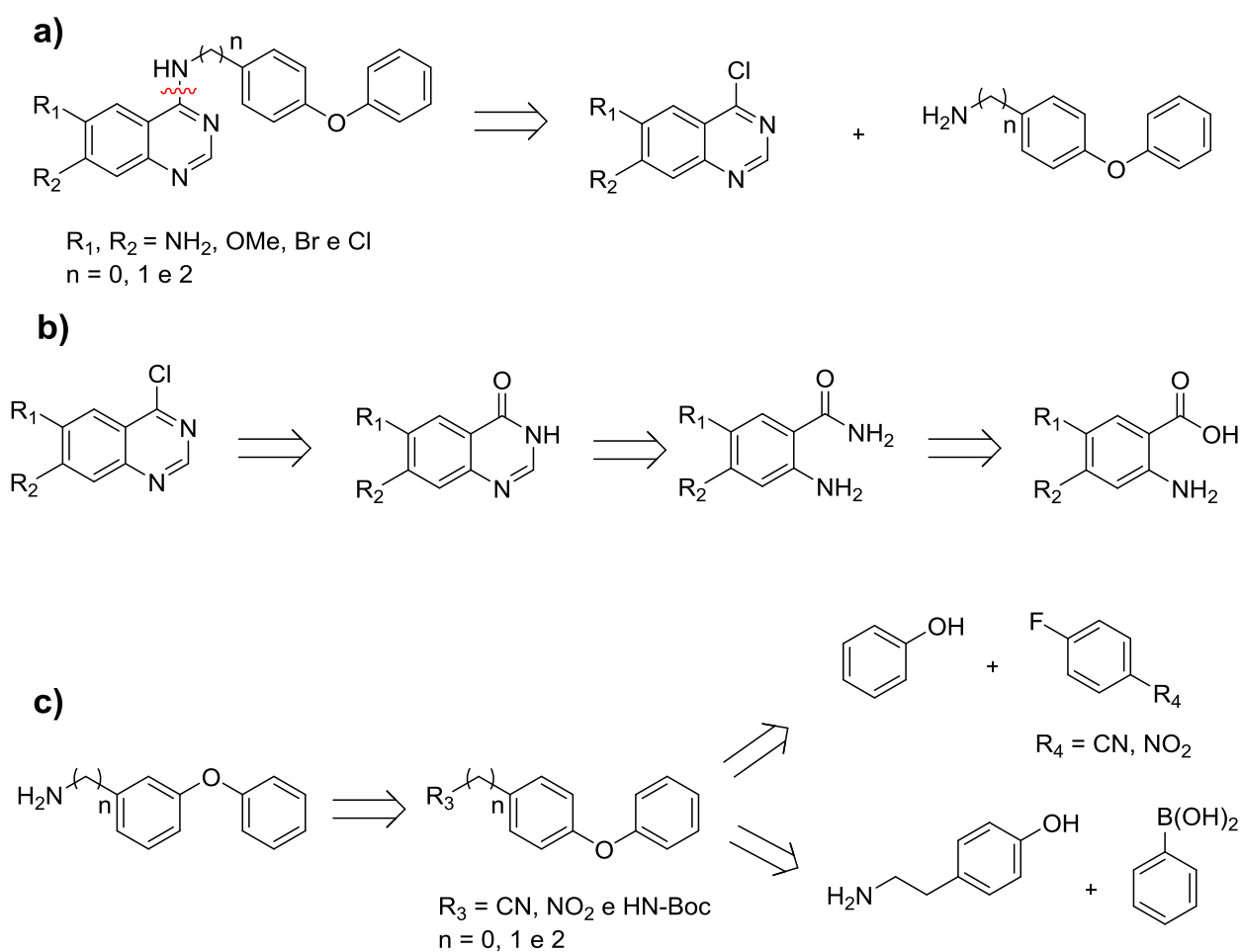
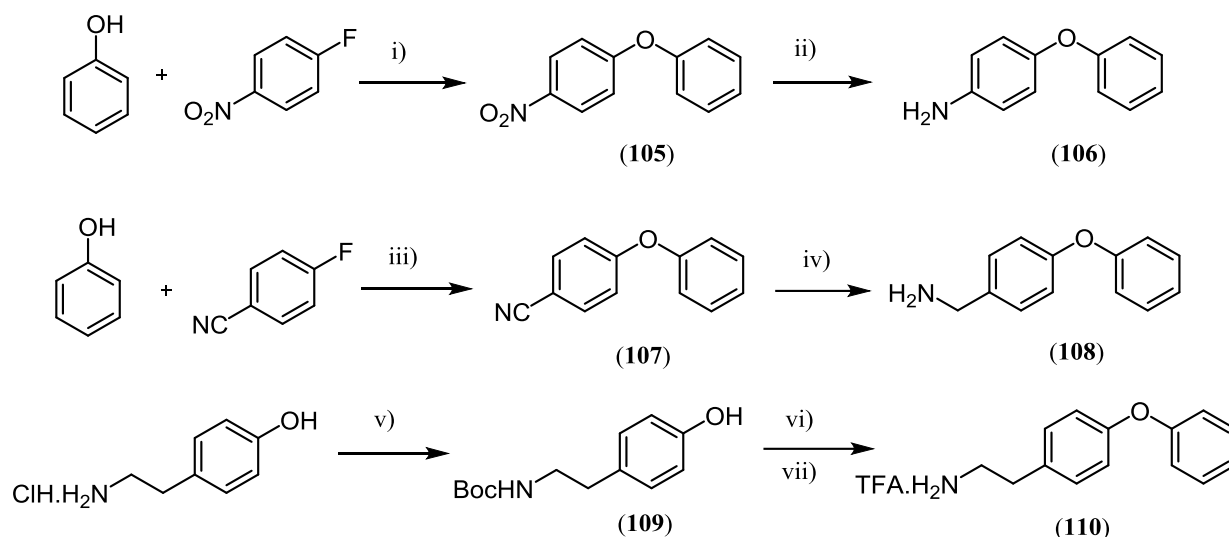


Figura 2.1 – Análise retrosintética para a síntese dos novos compostos derivados da quinazolina: **(a)** acoplamento quinazolínico final dos compostos; **(b)** intermediários 4-cloroquinazolínicos; **(c)** aminas primárias laterais.

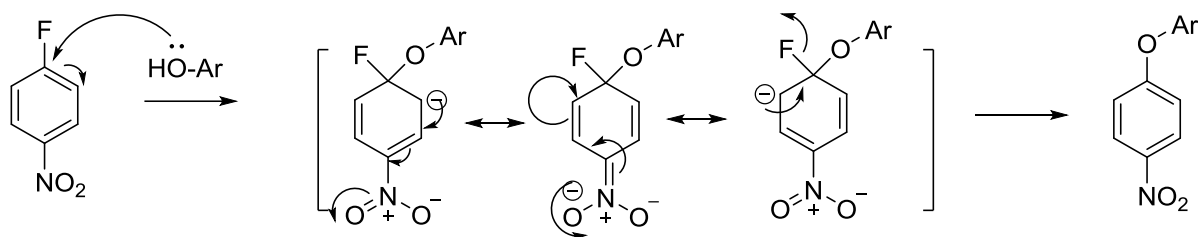
2.1.1 Aminas primárias laterais

O esquema reaccional e respectivos intermediários envolvidos neste processo sintético estão representados no Esquema 2.1. No caso da síntese das aminas laterais sem carbonos (**106**) e com um carbono na cadeia alquílica (**108**) a metodologia de síntese foi idêntica, recorrendo inicialmente a uma reacção de substituição nucleofílica aromática e, de seguida, a redução do grupo nitro (**105**) e do grupo nitrilo (**107**) à amina primária correspondente.



Esquema 2.1 - Reacções químicas efectuadas para obter as aminas laterais **106**, **108** e **110**. Reagentes e condições: i) CuI, Na₂CO₃, DMF, refluxo; ii) TES, Pd/C-10%, MeOH, t.a.; iii) Na₂CO₃, DMF, refluxo; iv) LiAlH₄, THF, t.a.; v) Boc₂O, Et₃N, H₂O/1,4-dioxano, t.a.; vi) Cu(OAc)₂, piridina, crivos moleculares 3Å, DCM, Ar-B(OH)₂, t.a.; vii) TFA, DCM, t.a.;

A reacção de S_NAr efectuada entre o fenol e o 1-fluoro-4-nitrobenzeno deu origem ao 1-nitro-4-fenoxibenzeno, **105**, com um rendimento de 87 % (passo *i*, Esquema 2.1). O ataque nucleofílico do fenol ao carbono 1 do anel aromático do 1-fluoro-4-nitrobenzeno só é possível devido à presença do grupo nitro na posição 4 e de um bom grupo abandonante, como é o caso do flúor. Neste caso, o grupo nitro que é um grupo fortemente electroatractor activa a posição *orto* e *para* do anel aromático (em realção ao nitro), e por ser um desactivante de anel (director *meta*) permite que o carbono do anel aromático ao qual está ligado suporte uma carga negativa, tal como a posição *meta*, activando assim a substituição nucleofílica aromática. Como se pode ver no esquema do mecanismo reaccional (Esquema 2.2), a reacção produz-se essencialmente em dois passos: **i**) o ataque do nucleófilo no carbono 1 do anel aromático com a formação de um carbanião; **ii**) saída do grupo abandonante deste mesmo carbanião com a formação do produto desejado. Para além do efeito indutivo causado pelo grupo nitro, o efeito de ressonância intensifica a activação da substituição nucleofílica aromática – Esquema 2.2.



Esquema 2.2 – Mecanismo geral das reacções de substituição nucleofílica aromática activadas por grupos electroattractores. Ar = benzeno

No caso da reacção que dá origem ao composto **107**, a metodologia é idêntica à reportada anteriormente (S_NAr ; passo *iii*, Esquema 2.1). No entanto, o grupo electroattractor presente na posição 4 do anel aromático é um grupo nitrilo, fazendo com que a subsequente redução deste grupo funcional, permita obter a amina primária com um carbono na cadeia alquílica. As condições usadas na síntese do 4-fenoxibenzonitrilo **107** foram efectuadas de acordo com o procedimento descrito por Rodrigues *et al.*¹³¹, obtendo-se 87 % de rendimento.

Ambos os compostos **105** e **107**, foram analisados por 1H -RMN e COSY (1H - 1H) permitindo afirmar o sucesso dos dois passos sintéticos. Os espectros de 1H -RMN (Figura 2.2a) das moléculas **105** e **107** revelam o desdobramento de um tripleto com $\delta = 7.26$ ppm e $\delta = 7.23$ ppm, respectivamente. Este sinal é característico deste tipo de éteres difenílicos, correspondente ao desdobramento que protão em C4' (atribuições no capítulo 6.2.1) sofre devido ao efeito causado pelos protões em C3'. Por outro lado, os protões em C3' a $\delta = 7.44$ ppm e $\delta = 7.42$ ppm, respectivamente, são quimicamente equivalentes, desdobrando-se num tripleto pelo acoplamento tanto com os protões em C2' como com o protão em C4', como se verifica pelo espectro de COSY do composto **105** (Figura 2.2b). Observa-se também o duplete a $\delta = 7.09$ ppm e $\delta = 7.07$ ppm correspondente aos protões em C2' (equivalentes) devido ao efeito dos protões, também, quimicamente equivalentes em C3'. Quanto aos protões em C2 observa-se o desdobramento de um duplete devido ao acoplamento com os protões em C3, que são igualmente equivalentes, verificando-se mais uma vez no espectro bidimensional do composto **105** (Figura 2.2b). O mesmo acontece para os protões em C3 ($\delta = 7.01$ ppm e $\delta = 7.00$ ppm).

A principal diferença nos espectros de 1H -RMN destes dois compostos está no valor do desvio químico a que aparecem os sinais correspondentes aos protões, ou seja, como o grupo nitro é mais electroattractor que o grupo nitrilo, todos os sinais vão aparecer a valores de δ mais altos devido à maior desblindagem dos mesmos (campo mais baixo). O sinal mais representativo desta situação é o sinal correspondente aos protões em C2 ($\delta = 8.20$ ppm e $\delta = 7.60$ ppm) pois situam-se em posição *orto* em relação ao nitro – Figura 2.2a.

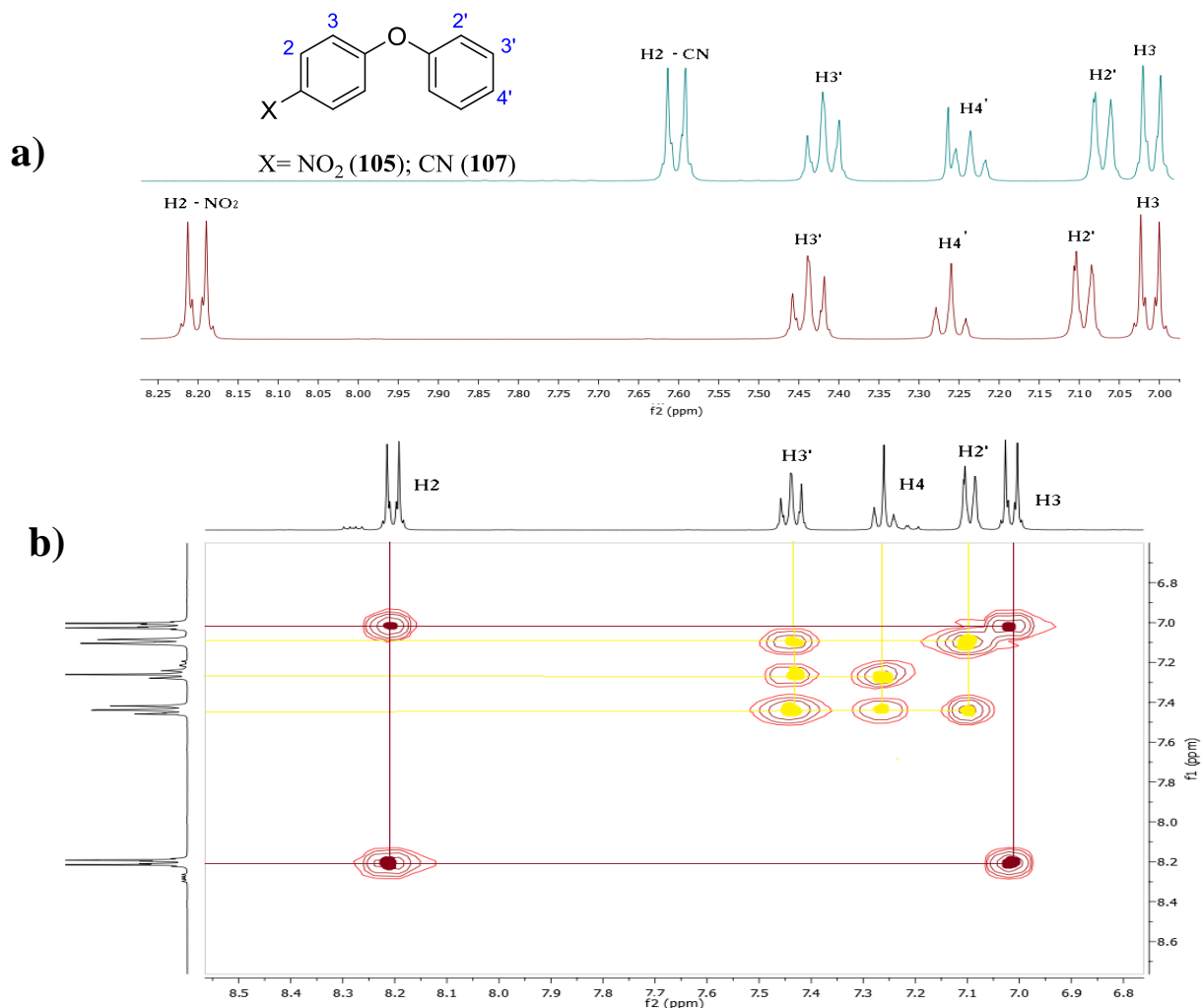
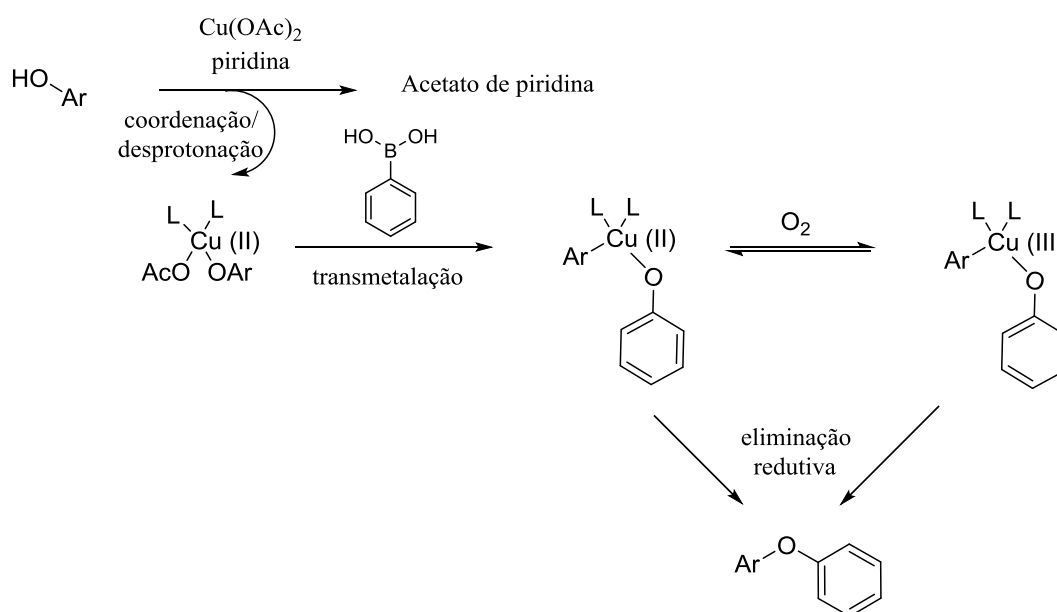


Figura 2.2 – a) Representação parcial do espectro de ¹H-RMN dos compostos **105** (espectro a vermelho) e **107** (espectro a azul). **b)** Representação parcial do espectro bidimensional COSY (¹H-¹H) do 4-fenoxi-1-nitrobenzeno, **105**. Os prótons de cada anel aromático apresentam uma cor característica, nomeadamente: a cor amarelo os prótons H2' – H4' e a cor castanho os prótons H2 e H3.

As aminas primárias **106** e **108** foram obtidas através de uma reacção de redução dos grupos nitro e nitrilo, respectivamente. Apesar de ambos os passos sintéticos serem reacções de redução, as condições reaccionais foram diferentes. Na obtenção da 4-fenoxianilina **106** (passo *ii*, Esquema 2.1) foi utilizado trietilsilano (TES) que ao reagir com o catalisador (Pd/C-10%) gera hidrogénio molecular *in situ* levando a uma redução rápida e eficiente do grupo nitro à amina correspondente, com um rendimento de 75 %. Esta reacção foi seguida por um protocolo relativamente recente reportado por *Mandal et al.*¹³² que demonstra a eficiência do TES na redução de grupos nitro, azidas, iminas, ligações duplas e triplas e desprotecção de grupos benzilo e alilo. No caso da síntese da amina **72** (passo *iv*, Esquema 2.1), é alcançada através da redução do grupo nitrilo com LiAlH₄, onde se dá um ataque nucleofílico, primeiro, por um ião hidreto que forma um intermediário tetraédrico devido à coordenação do azoto com o alumínio. Ao reduzir a ligação tripla a ligação dupla, é transferido outro ião hidreto que reduz a ligação dupla, formando a amina final **108** com

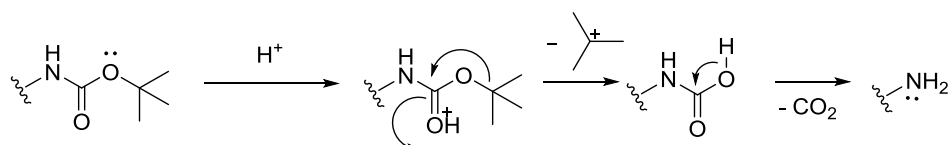
um rendimento de 71 %. Através da análise dos espectros de ^1H -RMN foi possível verificar no caso do composto **106** a presença de um singuleto largo aproximadamente a $\delta = 3$ ppm (ver capítulo 6.2.1.2) correspondente aos dois prótons da amina e, no composto **108**, é de notar o aparecimento de um singuleto com $\delta = 3.86$ ppm que corresponde ao CH_2 formado pela redução do grupo nitrilo. Este último sinal está de acordo com a literatura onde este mesmo composto é caracterizado.¹³³

Por sua vez, na obtenção da amina final com dois carbonos na cadeia alquílica, utilizou-se uma metodologia diferente das aplicadas anteriormente. Inicialmente, o cloreto de tiramina foi protegido com um grupo *tert*-butilóxicarbonilo com Boc_2O (passo v, Esquema 2.1). A reacção realizou-se em condições básicas, obtendo-se o composto **109** com bom rendimento (89 %), visto que por ^1H -RMN foi possível identificar o singuleto característico dos nove prótons quimicamente equivalentes correspondentes ao grupo *tert*-butilo do grupo de protecção carbamato ($\delta = 1.44$ ppm). Com a amina primária protegida **109**, foi possível prosseguir para o próximo passo, que consistiu na introdução de um grupo fenilo no grupo álcool para formar o éter de diarilo correspondente (passo vi, Esquema 2.1). A introdução do anel aromático foi realizada através de um acoplamento *Chan-Lam* que permite a formação de ligações carbono-heteroátomo via acoplamento oxidativo de um ácido fenil-borónico em atmosfera ambiente. Esta reacção é induzida, neste caso, pela piridina e por uma quantidade estequiométrica de Cu (II) que depois é reoxidado pelo oxigénio atmosférico. Este tipo de reacção com quantidades estequiométricas de Cu (II) é facilitada pelo oxigénio, pois a eliminação redutiva de espécies Cu (III) é muito rápida (Esquema 2.3).¹³⁴



Esquema 2.3. – Mecanismo geral do acoplamento *Chan-Lam* realizado no passo vi do Esquema 2.1. Ar = benzeno

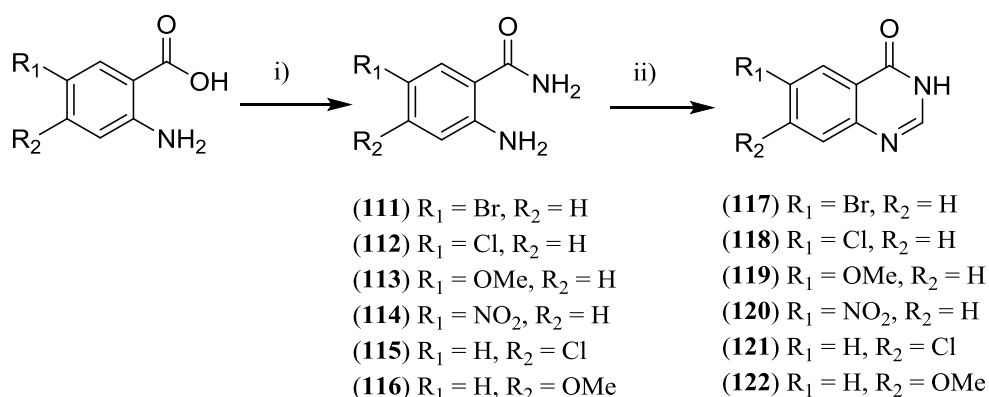
Finalmente, foi efectuada a desprotecção da amina via catálise ácida com TFA. O mecanismo de desprotecção envolve a libertação de CO₂ gasoso e a formação do carbocatião *tert*-butilo que sofre eliminação para formar isobutileno gasoso (Esquema 2.4). A amina **110**, obtida com rendimento quantitativo, foi identificada por ¹H-RMN, onde se verificou o desaparecimento do singuleto a campo alto correspondente aos nove prótons equivalentes do Boc e a campo baixo, a presença dos três prótons característicos da amina protonada ($\delta = 7.90$ ppm) - ver capítulo 6.2.1.7.



Esquema 2.4. – Mecanismo geral da desprotecção do grupo *tert*-butilcarbamato com TFA.

2.1.2 Síntese das Quinazolin-4(3*H*)-onas

As quinazolin-4(3*H*)-onas **117** – **122**, intermediários na síntese do núcleo de quinazolina (Figura 2.1b – retrosíntese), foram obtidas em dois passos sintéticos a partir dos ácidos antranílicos correspondentes (Esquema 2.5). A metodologia usada para a síntese destas quinazolonas intermediárias teve como base o trabalho experimental reportado na literatura por Masanori *et al.*⁹⁸, segundo o qual se efectuou a amidação do ácido antranílico correspondente para fornecer as 2-aminobenzamidas **111** – **116** e posterior ciclização das quinazolin-4(3*H*)-onas com ortoformato de trimetilo, envolvendo catálise ácida.



Esquema 2.5. - Reacções químicas efectuadas para obter as quinazolin-4(3*H*)-onas **117** – **122**. Reagentes e condições: (i) HOBT·xH₂O, EDC·HCl, DMF, NH₃ 25 %, t.a.; (ii) CH(OMe)₃, HCl 37 %, t.a;

As aminobenzamidas **111** – **116** foram obtidas através de uma reacção de acoplamento com a carbodiimida EDC•HCl e o 1-hidroxibenzotriazole (HOBt) com rendimentos entre os 26 - 99 %, tendo sido as suas purezas verificadas através dos espectros de ^1H -RMN que estão de acordo com a literatura^{98,130} e pela determinação dos seus pontos de fusão (ver capítulo 6.2.2).

Como se pode verificar na Tabela 2.1. os valores de rendimento são substancialmente mais baixos na posição 4 do que na posição 5. Isto pode ser explicado pelo facto dos grupos presentes na posição 4 serem dadores de electrões (o grupo metoxilo é electrodador por efeito de ressonância e o cloro por efeito indutivo, que se transmite através das ligações sigma). O facto de serem dadores de carga electrónica e estarem na posição 4 em relação ao carbonilo faz com que nesta mesma posição exista uma maior densidade electrónica, ficando o carbono carbonílico menos electrofílico. Por outro lado, os rendimentos mais baixos do grupo metoxilo devem-se não só ao efeito de ressonância mas também ao efeito indutivo através das ligações sigma.

Tabela 2.1 – Rendimento, padrão espectral e respectivo desvio químico de ^1H -RMN para os protões dos compostos **111** – **116**. O solvente utilizado foi DMSO- d_6 a uma frequência de 400 MHz.

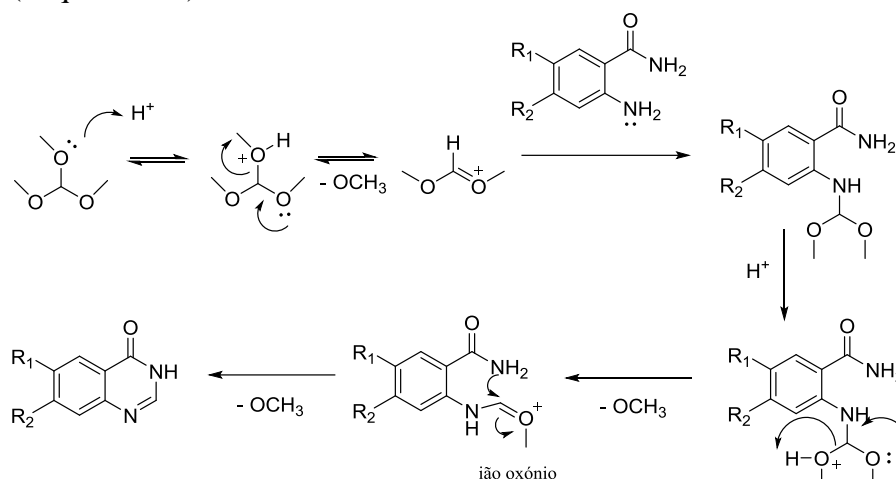
^1H -RMN	CONH ₂	NH ₂	Ar-H ³	Ar-H ⁴	Ar-H ⁵	Ar-H ⁶	OCH ₃	η (%)
111 (5-Br)	br s, 7.83 e 7.16	br s, 6.70	d, 6.65 $J = 8.8$	dd, 7.25 $J = 8.8, 1.2$	-	d, 7.69 $J = 1.2$	-	82
112 (5-Cl)	br s, 7.83; m, 7.19-7.12	br s, 6.71	d, 6.69 $J = 3.6$	m, 7.19-7.12	-	d, 7.59 $J = 2.0$	-	71
113 (5-OMe)	br s, 7.72; m, 7.09-7.01	br s, 6.07	d, 6.59 $J = 8.8$	dd, 6.79 $J = 8.8, 2.8$	-	m, 7.09-7.01	s, 3.63	26
114 (5-NO ₂)	br s, 8.22 e 7.42	br s, 7.90	d, 6.79 $J = 9.2$	d, 8.01 $J = 9.2$	-	s, 8.55	-	99
115 (4-Cl)	br s, 7.79 e 7.17	br s, 6.83	d, 6.73 $J = 2.0$	-	dd, 6.48 $J = 8.8, 2.0$	d, 7.53 $J = 8.8$	-	54
116* (4-OMe)	-	br s, 6.73	d, 6.18 $J = 3.2$	-	dd, 6.05 $J = 12.0, 3.2$	d, 7.48 $J = 12.0$	s, 3.63	35

Da análise da Tabela 2.1 é relevante realçar que o sinal dos dois protões correspondentes à amida aparecem, em todos os casos, como singuletos separados e a desvio químico substancialmente diferente. Isto acontece devido ao par de electrões presente no azoto poder entrar em ressonância com o carbonilo, causando restrição da rotação da ligação C-N. Esta é a razão para que os protões da amida não sejam quimicamente equivalentes e apareçam a desvios químicos diferentes.^{135,136}

Por outro lado, o protão em C6 ressoa a campo mais baixo, consistente com uma maior desblindagem devido à presença em *orto* do grupo amida, por vezes, devido à presença de grupos atractores de electrões na posição C5 (-Cl, -Br, -NO₂).

Sintetizadas e identificadas as 2-aminobenzamidas **111** - **116**, foi possível prosseguir para o passo sintético seguinte onde se obtiveram as quinazolin-4(3H)-onas **117** – **122** (passo *ii*, Esquema

2.5) com o do fecho do anel de quinazolona através de uma catálise ácida. O carbono adicional que é necessário para a ciclização provém de um orto éster (ortoformato de trimetilo) que quando hidrolisado em condições ácidas forma um sal de oxigénio, o qual reage com a amina aromática para gerar o ião oxónio. Este reage com a amida, completando assim, a ciclização do anel de quinazolona (Esquema 2.6).



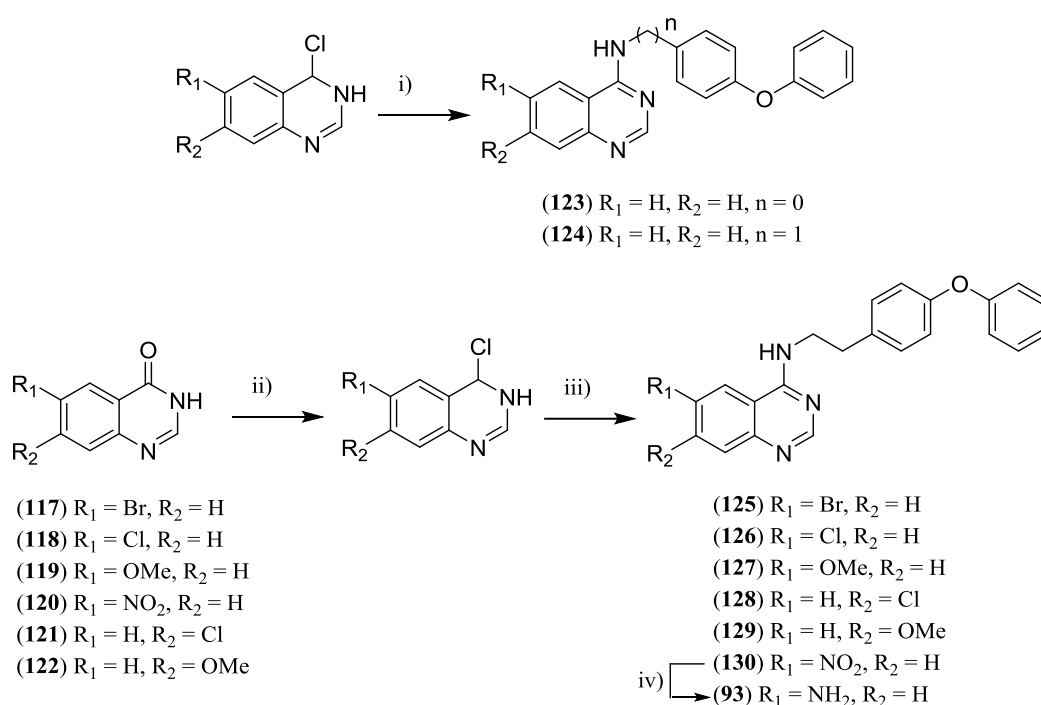
Esquema 2.6. – Representação geral do mecanismo da reacção de ciclização do anel de quinazolona dos compostos **117 - 122**, na presença de HCl e ortoformato de trimetilo.

As quinazolin-4(3*H*)-onas **117 - 122** foram obtidos com bons rendimentos entre 77–90 %, o que sugere que esta reacção de formação de heterocíclis com o ortoformato de trimetilo é bastante eficiente. A pureza dos compostos **117 – 122** foi confirmada através dos espectros de ^1H -RMN que estão de acordo com a literatura.^{98,130} Em todos os intermediários é possível verificar o aparecimento de um singuleto, a campo baixo, correspondente ao próton em C2 e o desaparecimento dos três prótons correspondentes à amina aromática e à amida das 2-aminobenzamidas. O próton mais desblindado correspondente ao NH no anel de quinazolona também foi identificado (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. – Rendimento, padrão espectral e respectivo desvio químico de ^1H -RMN para os prótons dos compostos **117 – 122**. O solvente utilizado foi DMSO- d_6 a uma frequência de 400 MHz.

^1H -RMN	CONH	Ar-H2	Ar-H5	Ar-H6	Ar-H7	Ar-H8	OCH ₃	η (%)
117 (6-Br)	br s, 12.43	s, 8.20	s, 8.13	-	d, 7.96 $J = 8.8$	d, 7.62 $J = 8.8$	-	77
118 (6-Cl)	br s, 12.43	s, 8.13	d, 8.06 $J = 2.0$	-	dd, 7.85 $J = 8.8, 2.0$	d, 7.70 $J = 8.8$	-	80
119 (6-OMe)	br s, 12.15	s, 7.96	d, 7.60 $J = 8.8$	-	dd, 7.40 $J = 8.8, 2.8$	d, 7.49 $J = 2.8$	s, 3.85	91
120 (6-NO ₂)	br s, 12.78	s, 8.32	s, 8.80	-	d, 8.55 $J = 7.6$	d, 7.87 $J = 8.9$	-	93
121 (7-Cl)	br s, 12.42	s, 8.14	d, 8.11 $J = 8.5$	dd, 7.56 $J = 8.5, 1.2$	-	s, 7.73	-	99
122 (7-OMe)	br s, 12.11	s, 8.06	d, 8.01 $J = 9.6$	m, 7.12–7.06	-	m, 7.12–7.06	s, 3.89	94

2.1.3 4-Aminoquinazolininas finais



Esquema 2.7 - Reacções químicas efectuadas na obtenção das 4-aminoquinazolininas **93** e **123 – 130**. Reagentes e condições: (i) 4-cloroquinazolinina comercial, aminas **106** e **108**, Et_3N , i -PrOH, 80 W, $80^\circ C$ (ii) **a- 117-122**, DIPEA, tolueno, refluxo; **b-** $POCl_3$, $80^\circ C$; (iii) sal de TFA **110**, Et_3N , DCM: i -PrOH (2:1), $50^\circ C$; (iv) H_2 , Pd/C-10%, MeOH, t.a.

A síntese das 4-aminoquinazolininas finais (**93** e **123 – 130**) foi realizada através do acoplamento entre as aminas laterais **106**, **108** e **110** e as respectivas 4-cloroquinazolininas. As 4-aminoquinazolininas finais **123** e **124** sem substituintes nas posições 6 e 7 da quinazolinina, foram obtidas com 80 e 56 % de rendimento, respectivamente, em apenas um passo, envolvendo a reacção de substituição nucleofílica aromática entre a 4-cloroquinazolinina comercial e as aminas **106** e **108**.

Por espectroscopia de 1H -RMN e COSY (1H - 1H) foi possível identificar os padrões mais característicos dos compostos em questão, nomeadamente, os prótons do sistema quinazolinínico, da cadeia alquílica lateral (quando presentes) e do éter de diarilo. Tal como descrito anteriormente por Masanori *et al.*⁹⁸, em compostos como o **123**, sem carbonos na cadeia alquílica lateral, o próton mais desblindado, nomeadamente a $\delta = 9.82$ ppm, corresponde ao NH (Figura 2.3a). O singuleto correspondente ao próton em C2 do sistema quinazolinínico também aparece a campo baixo ($\delta = 8.57$ ppm) devido à desblindagem por estar entre dois átomos electronegativos e também devido ao efeito de ressonância. Quanto aos outros prótons do sistema quinazolinínico, o próton em C8 é o segundo mais desblindado ($\delta = 8.54$ ppm) devido ao efeito indutivo e anisotrópico, primeiro porque é o próton mais perto dos azotos e depois devido aos efeitos dos campos magnéticos gerados pela circulação de electrões π . Este próton desdobra-se num duplete devido ao acoplamento com o próton em C7 ($\delta = 8.64$ ppm), ao invés deste que aparece como triplete devido à sua interacção com

os prótons em C8 e C6 como é possível verificar através do espectro bidimensional COSY (Figura 2.3b). Observa-se também que o mesmo acontece para os prótons em C5 e C6. As constantes de acoplamento $^3J_{H-H}$ destes prótons ($^3J_{H-H} = 7,6 - 7,9$ Hz) estão de acordo com as constantes de acoplamento aromáticas reportadas na literatura para prótons posicionados em *orto* em relação ao núcleo analisado.¹³⁷

Relativamente aos prótons do éter de diarilo, o posicionamento dos seus sinais é explicado com base no próton em C4'' que se desdobra num tripleto devido ao acoplamento com os dois prótons quimicamente equivalentes em C3'' (Figura 2.3b). Através do espectro de COSY é possível verificar essa interação, tal como as restantes que são iguais às dos éteres de diarilo das aminas intermediárias expressas anteriormente.

Por espectroscopia de ^{13}C -RMN e técnica bidimensional HMQC, todos os carbonos da estrutura **123** foram identificados e estão de acordo com a literatura.^{98,130} Neste caso, o C2 é o carbono mais desblindado, uma vez que se encontra entre dois átomos electronegativos.

Pela análise do espectro de infravermelho foram ainda identificadas as bandas características da amina e CH_{arom} ($\nu_{\text{max}} = 3055$ e 3041 cm^{-1} , respectivamente), ligações $\text{C}=\text{C}_{\text{arom}}$ ($\nu_{\text{max}} = 1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) e o éter de diarilo ($\nu_{\text{max}} = 1236\text{ cm}^{-1}$).

Por espectrometria de massa confirmou-se a presença do pico base para o composto, $[\text{M} + \text{H}]^+$ a m/z 314,24. Finalmente a pureza do composto foi determinada usando análise elementar.

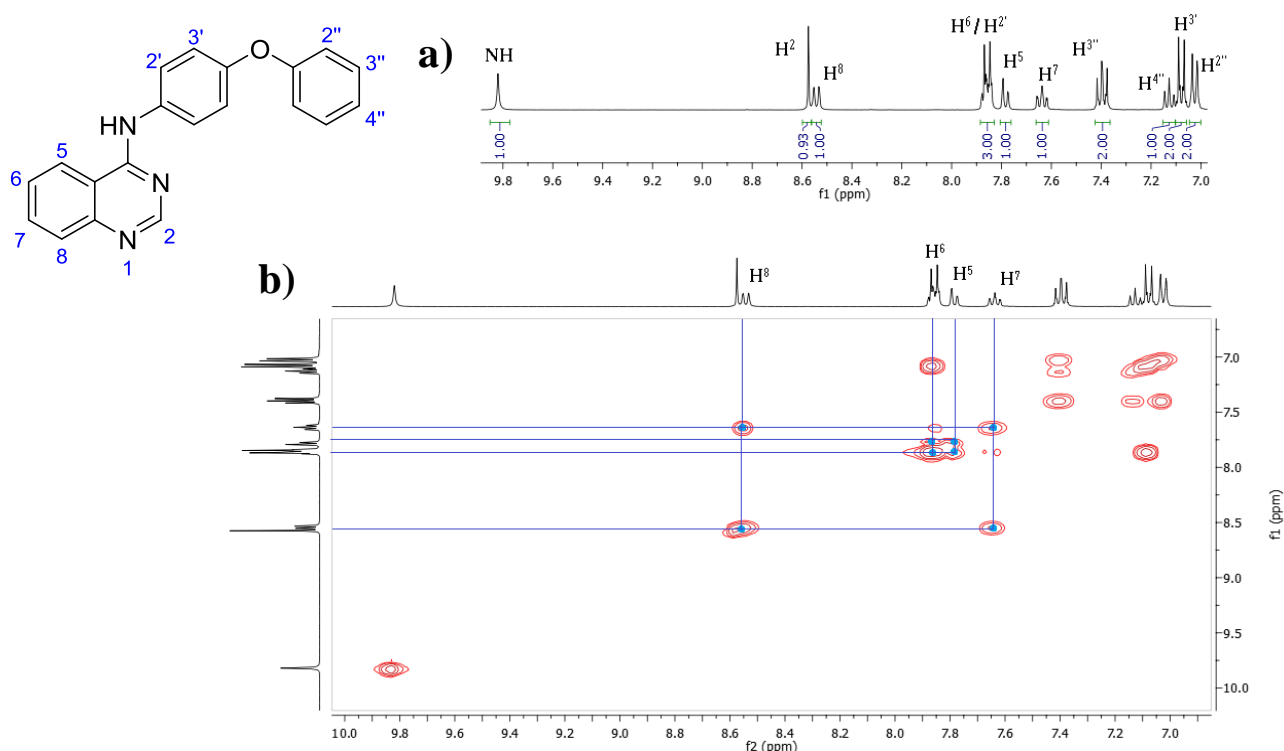
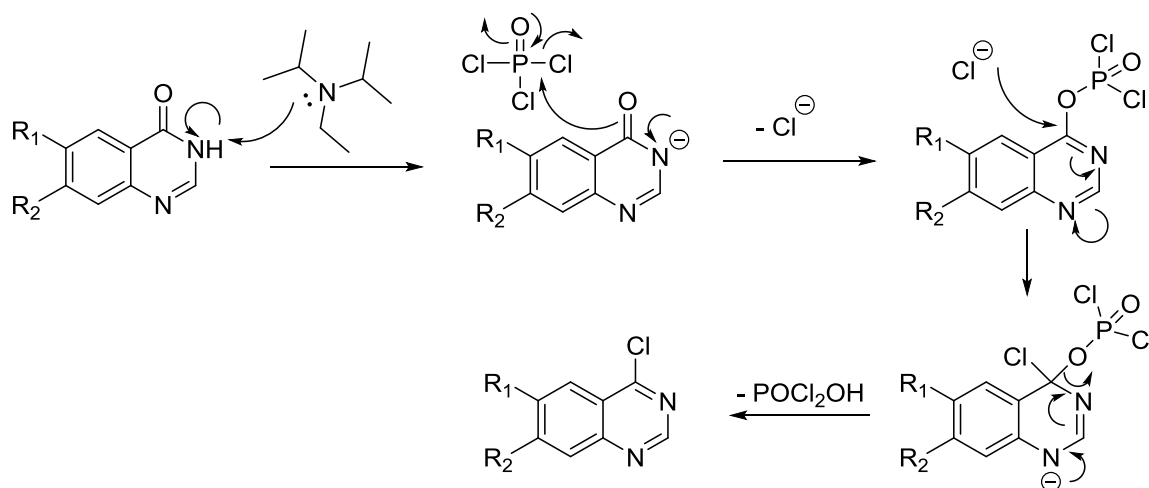


Figura 2.3 – a) Representação parcial do espectro de ^1H -RMN da 4-aminoquinazolina **123**. b) Representação parcial do espectro bidimensional COSY (^1H - ^1H) do composto **123**. Evidência das interações entre os prótons do sistema quinazolínico a azul.

No caso da 4-aminoquinazolina **124**, foram também analisadas as características espectroscópicas através de ^1H -RMN, COSY (^1H - ^1H), ^{13}C -RMN e HMQC (espectros em anexo). É de referir que, tanto os prótons correspondentes ao sistema quinazolínico como os prótons do éter de diarilo se comportam de igual forma aos prótons anteriormente analisados no composto **123**. Como se pode ver no Esquema 2.7, a diferença entre estas duas 4-aminoquinazolinas está na cadeia alquílica lateral, onde o composto **124** apresenta um carbono sp^3 nessa mesma cadeia. Esta é a característica estrutural na molécula **124** que define a diferença espectroscópica entre as duas, pois o facto do próton da amina estar adjacente a um CH_2 faz com que o sinal desse mesmo próton se desdobre num tripleto ($\delta = 8.80$ ppm) com uma $^3J_{\text{N-H}} = 5.8$ Hz, em linha com o reportado por Masanori *et al.*^{98,130} ($^3J_{\text{N-H}} = \sim 5,4$ Hz). Já os prótons correspondentes ao CH_2 desdobram-se num duplete ($\delta = 4.73$ ppm) devido ao acoplamento com o próton da amina. Esta interacção entre prótons é confirmada pelo espectro bidimensional de COSY, tal como a presença do carbono secundário do CH_2 no espectro de ^{13}C -RMN com um desvio químico típico de carbonos alifáticos ($\delta = 43.0$ ppm).

As 4-aminoquinazolinas **125** – **130** foram obtidas em dois passos sintéticos. O primeiro passo baseado num protocolo descrito por Sirisoma *et al.*¹³⁸ (passo *ii*, Esquema 2.7), consistiu na reacção dos intermediários **117** – **122** com o oxicloreto de fósforo (POCl_3) numa reacção de halogenação Vilsmeier, com a formação de uma imina como intermediário reaccional (Esquema 2.8).



Esquema 2.8 – Representação mecanística da reacção de halogenação Vilsmeier do principal intermediário da substituição final, na presença de oxicloreto de fósforo e DIPEA.

O segundo passo sintético que corresponde ao acoplamento quinazolínico final (passo *iii*, Esquema 2.7) é realizado através de uma reacção de substituição nucleofílica aromática na posição C4 de forma a obter as 4-aminoquinazolinas **125** – **130**. No entanto, a substituição final dos compostos **125** – **130** foi seguida através de um protocolo descrito na literatura por Kabri *et al.*¹³⁹. Na Tabela 2.3. estão representados os rendimentos globais dos passos *ii* e *iii* (60 – 86 %), bem

como, os valores de desvio químico de ^1H -RMN da função de quinazolina dos compostos finais **93** e **125** – **130**. No caso do composto **93**, foi obtido através de uma hidrogenação catalítica da molécula **130**, que reduziu o grupo funcional nitro à amina correspondente, com um rendimento de 98 %.

Tabela 2.3 – Rendimento, padrão espectral e respectivo desvio químico para os prótons do sistema quinazolínico dos compostos **93** e **125** – **130**. O solvente utilizado foi DMSO- d_6 a uma frequência de 400 MHz.

^1H -RMN	Ar-H2	Ar-H5	Ar-H6	Ar-H7	Ar-H8	OCH ₃ ou NH ₂	η (%)
125 (6-Br)	s, 8.50	m, 8.49–8.44	-	dd, 7.86 $J = 8.8, 1.6$	d, 7.60 $J = 8.8$	-	86
126 (6-Cl)	m, 8.47–8.42	d, 8.35 $J = 1.2$	-	dd, 7.74 $J = 8.8, 1.2$	d, 7.70 $J = 8.8$	-	76
127 (6-OMe)	s, 8.33	m, 7.59–7.54	-	m, 7.36–7.28	m, 7.59–7.54	s, 3.81	70
128 (7-Cl)	s, 8.48	d, 8.25 $J = 9.2$	dd, 7.56 $J = 9.0, 1.8$	-	d, 7.73 $J = 1.8$	-	81
129 (7-OMe)	s, 8.41	d, 8.11 $J = 9.2$	m, 7.13–7.06	-	m, 7.13–7.08	s, 3.87	78
130 (6-NO ₂)	s, 8.60	d, 9.34 $J = 2.5$	-	dd, 8.47 $J = 9.0, 2.5$	d, 7.83 $J = 9.0$	-	60
93 (6-NH ₂)	s, 8.21	d, 7.02 $J = 2.4$	-	m, 7.15–7.08	d, 7.41 $J = 8.8$	s, 5.41	98

Analisando a Tabela 2.3. podemos verificar que o desvio químico dos sinais correspondentes aos prótons quinazolínicos dos compostos **93** e **125** – **130** varia quando comparados com os mesmos prótons das 4-aminoquinazolinias **123** e **124** (Figura 2.2.), devido à introdução de grupos atractores (-Br, -Cl e -NO₂) e dadores (-OMe e -NH₂) de electrões nas posições 6 e 7 (R₁ e R₂, respectivamente) que vai alterar a blindagem dos prótons adjacentes a estes mesmos grupos.

Na generalidade dos compostos **93** e **125** – **130**, o próton em C2 é o mais desblindado do sistema quinazolínico ($\delta = 8.21$ – 8.60 ppm) devido à sua localização entre dois átomos de azoto electronegativos (efeito indutivo e ressonância). No entanto, é de realçar que na 4-aminoquinazolina **130** substituída na posição 6 com o grupo nitro, o próton mais desblindado é o próton em C5.

Numa análise mais detalhada da Tabela 2.3. é possível verificar que para todos os grupos electroatractores na posição 6 (-Br, -Cl e -NO₂), os prótons *orto* em relação a estes grupos (prótons em C5 e C7 são os mais desblindados, ao contrários do sistema quinazolínico dos compostos **123** e **124**, onde o próton mais desblindado é o próton em C8, devido aos efeitos electrónicos dos átomos de azoto. No entanto, na presença de um grupo dador de electrões (-OMe e -NH₂), os prótons em C5 e C7 tornam-se mais blindados principalmente devido ao efeito de ressonância. Para os compostos **128** e **129** substituídos na posição 7 a análise dos prótons quinazolínicos é idêntica ao referido anteriormente.

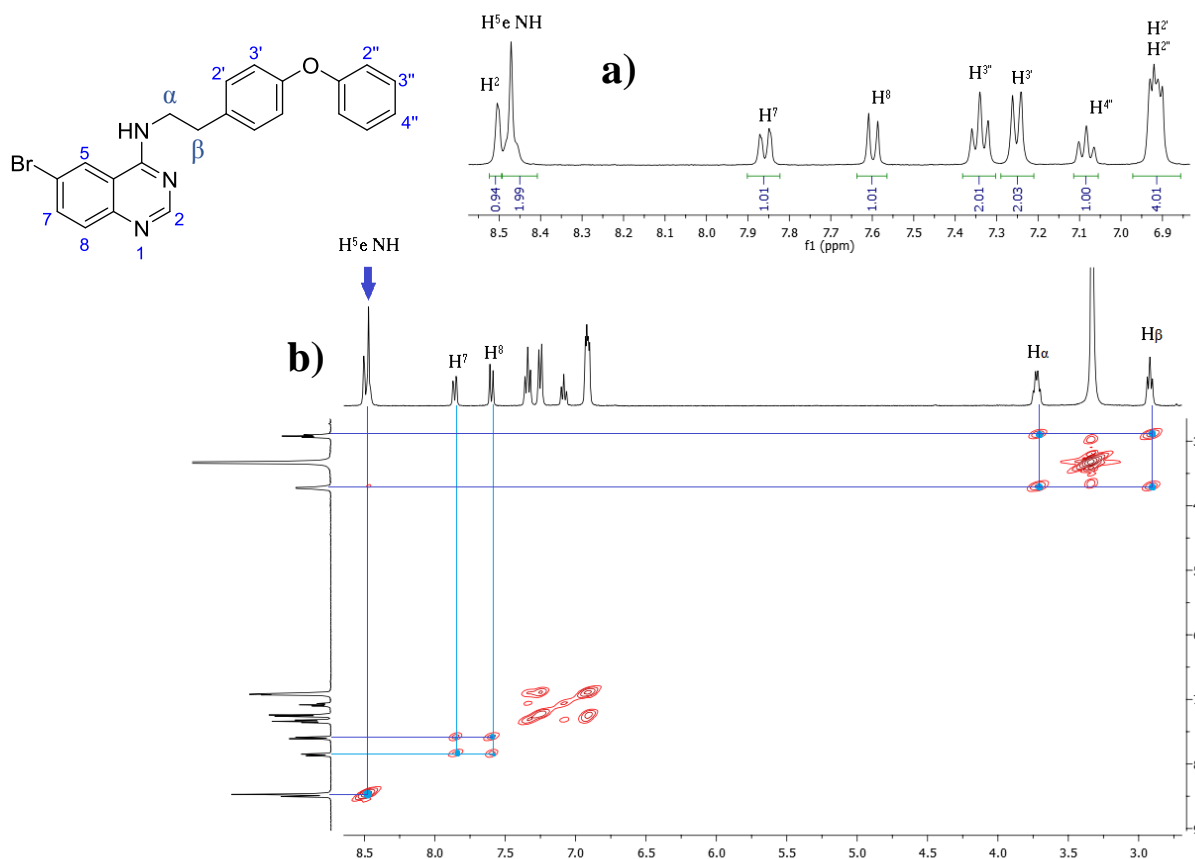


Figura 2.4 – a) Representação parcial do espectro de ^1H -RMN do composto **125**. b) Representação parcial do espectro bidimensional COSY (^1H - ^1H) da 4-aminoquinazolina **125**. Evidência das interações entre os prótons do sistema quinazolinico a azul.

Em particular, o próton em C5 aparece com um sinal desdobrado num duplete, devido ao acoplamento com o próton em C7, no entanto, a sua constante de acoplamento é pequena ($J = \sim 1\text{--}2\text{ Hz}$) por ser uma constante *meta* ($^4J_{\text{H-H}} = 2\text{ Hz}$), estando de acordo com o descrito na literatura.¹³⁷ Por sua vez, o sinal do próton em C8 aparece, também, como um duplete devido ao acoplamento com o próton em C7, mas a sua constante de acoplamento é *orto* ($J \sim 8\text{--}9\text{ Hz}$), o que também está de acordo com a literatura.¹³⁷ O sinal do próton em C7 apresenta-se, na sua generalidade, como um duplete de dupletos (Figura 2.4). Esta multiplicidade deve-se ao acoplamento directo com o próton em C8 e ao acoplamento de longa distância com o próton em C5. Por exemplo, no caso do composto **125** foram calculadas duas constantes de acoplamento que deram origem à referida multiplicidade: $^3J_{\text{H-H}} = 8.8\text{ Hz}$ e $^4J_{\text{H-H}} = 1.6\text{ Hz}$ (Figura 2.5.). O mesmo acontece para os compostos substituídos na posição C7.

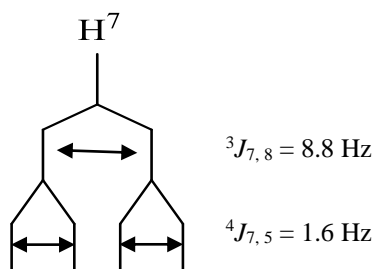


Figura 2.5 – Diagrama representativo do acoplamento entre o próton H7 e os prótons H8 e H5 da 4-aminoquinazolina **125**.

Por espectroscopia ^{13}C -RMN e HMQC foi possível identificar todos os carbonos e no caso particular do C2, verificou-se que este era o mais desblindado do sistema quinazolínico, em todos os compostos finais. A título de exemplo está representado na Figura 2.6. o espectro de HMQC da 4-aminoquinazolina **125**.

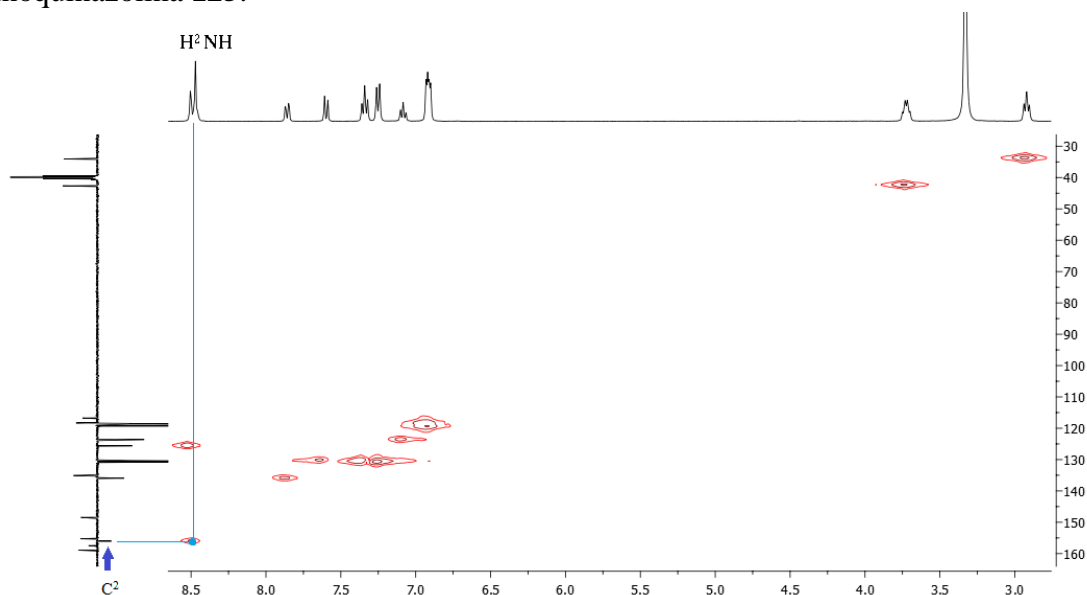


Figura 2.6 – Representação do acoplamento entre o próton H2 do sistema quinazolínico e o C2 do composto **125** através do espectro bidimensional de HMQC. Interação evidenciada a azul.

A Tabela 2.4 é relativa aos prótons presentes nas aminas laterais dos compostos **93** e **125** – **130**. Como se pode verificar no Esquema 2.7, estes compostos contêm uma cadeia alquílica lateral com dois carbonos, o que torna diferente o desvio químico dos prótons aromáticos do éter de diarilo em C2' e C3' quando comparados com os compostos **123** e **124**, devido ao efeito indutivo causado por estes dois carbonos (dadores de carga por indução). Como se pode verificar na Tabela 2.4., os prótons em C2' em posição *orto* em relação à cadeia alquílica encontram-se mais blindados que os prótons em C3'.

Tabela 2.4 – Padrão espectral e respectivo desvio químico de ^1H -RMN para os prótons das aminas laterais dos compostos **93** e **125** – **130**. O solvente utilizado foi DMSO- d_6 a uma frequência de 400 MHz.

^1H - RMN	NH	NHCH ₂	NHCH ₂ CH ₂	Ar-H2'	Ar-H3'	Ar-H2''	Ar-H3''	Ar-H4''
125 (6-Br)	m, 8.49- 8.44	q, 3.72 <i>J</i> = 6.8	t, 2.92 <i>J</i> = 7.4	m, 6.95-6.89	d, 7.25 <i>J</i> = 8.4	m, 6.95- 6.89	t, 7.34 <i>J</i> = 7.8	t, 7.08 <i>J</i> = 7.4
126 (6-Cl)	m, 8.47- 8.42	q, 3.72 <i>J</i> = 6.7	t, 2.92 <i>J</i> = 7.4	m, 6.93-6.88	d, 7.25 <i>J</i> = 8.0	m, 6.93- 6.88	t, 7.33 <i>J</i> = 8.0	t, 7.08 <i>J</i> = 7.4
127 (6-OMe)	t, 8.18 <i>J</i> = 5.4	q, 3.70 <i>J</i> = 6.8	t, 2.90 <i>J</i> = 7.4	m, 6.92 - 6.86	d, 7.23 <i>J</i> = 8.4	m, 6.92 - 6.86	m, 7.36- 7.28	t, 7.05 <i>J</i> = 7.4
128 (7-Cl)	t, 8.54 <i>J</i> = 5.2	q, 3.75 <i>J</i> = 6.6	t, 2.94 <i>J</i> = 7.2	m, 6.96-6.91	d, 7.27 <i>J</i> = 8.4	m, 6.96- 6.91	t, 7.36 <i>J</i> = 7.8	t, 7.11 <i>J</i> = 7.4
129 (7-OMe)	t, 8.22 <i>J</i> = 5.2	q, 3.73 <i>J</i> = 6.7	t, 2.93 <i>J</i> = 7.4	t, 6.94 <i>J</i> = 7.6	d, 7.27 <i>J</i> = 8.4	t, 6.94 <i>J</i> = 7.6	t, 7.36 <i>J</i> = 7.8	m, 7.13- 7.06
130 (6-NO ₂)	t, 9.12 <i>J</i> = 5.2	q, 3.80 <i>J</i> = 6.7	t, 2.97 <i>J</i> = 7.2	m, 6.96-6.92	d, 7.29 <i>J</i> = 8.4	m, 6.96- 6.92	t, 7.36 <i>J</i> = 8.0	t, 7.11 <i>J</i> = 7.4
93 (6-NH ₂)	t, 7.79 <i>J</i> = 5.4	q, 3.70 <i>J</i> = 6.8	t, 2.93 <i>J</i> = 7.4	t, 6.95 <i>J</i> = 8.6	d, 7.27 <i>J</i> = 8.4	t, 6.95 <i>J</i> = 8.6	t, 7.37 <i>J</i> = 8.0	m, 7.15- 7.08

Relativamente ao desdobramento dos sinais, o protão em C4'' revelou ser um sinal característico deste tipo de éteres de diarilo, uma vez que aparece desdobrado como um tripleto isolado ($\delta = 7.04 - 7.13$ ppm) a integrar para um protão, possibilitando as restantes integrações na proporção certa. Apesar deste sinal aparecer como um tripleto, um espectro com mais scans, poderia possibilitar ver o seu verdadeiro desdobramento (tripleto de tripletos), uma vez que, teoricamente, acopla através de uma contante grande (J_{orto}) com os protões C3'' e com uma constante pequena (J_{meta}) com os protões em C2'' (Figura 2.7a). No caso dos sinais dos protões em C2'', que aparecem sobrepostos com os protões dos C2', o seu desdobramento seria correcto aparecer como um duplete de dupletos, devido ao acoplamento, inicialmente, com os protões em C3'' (quimicamente equivalentes) e depois com o protão em C4'' (Figura 2.7b). O desdobramento do sinal dos protões C3'' apresenta-se como um tripleto ($\delta = 7.28 - 7.37$ ppm) devido ao acoplamento *orto* ($J \sim 7-8$ Hz) quer com os protões em C2'' quer com o protão em C4''.

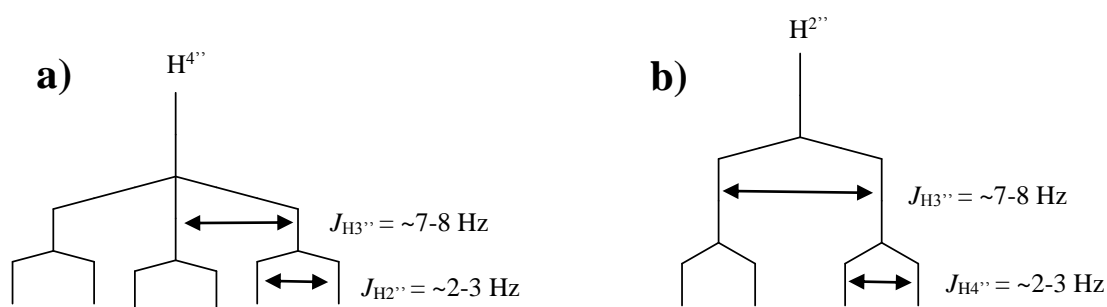


Figura 2.7 – Diagrama representativo do desdobramento expectável dos protões: **(a)** H4'' e **(b)** H2'' das 4-aminoquinazolininas **93** e **125 – 130**.

Como já foi dito anteriormente, os compostos **93** e **125 – 130** contêm uma cadeia alquílica lateral com dois carbonos. A correlação entre os protões destes carbonos alifáticos foi verificada pelas técnicas de ^1H -RMN, COSY, HMQC e HMBC. É de realçar que os protões do carbono α adjacente à amina apresentam-se no espectro de ^1H -RMN como um quarteto, pela sobreposição dos dupletos que derivam da interacção com o protão da amina (Figura 2.8b). No entanto, numa análise mais cuidada deste sinal, esperar-se-ia que estes protões se desdobrassem um tripleto de dupletos, devido ao acoplamento, primeiro com os protões do carbono β ($J \sim 7$ Hz), seguido da interacção com o protão da amina ($J \sim 5$ Hz) - Figura 2.8a.

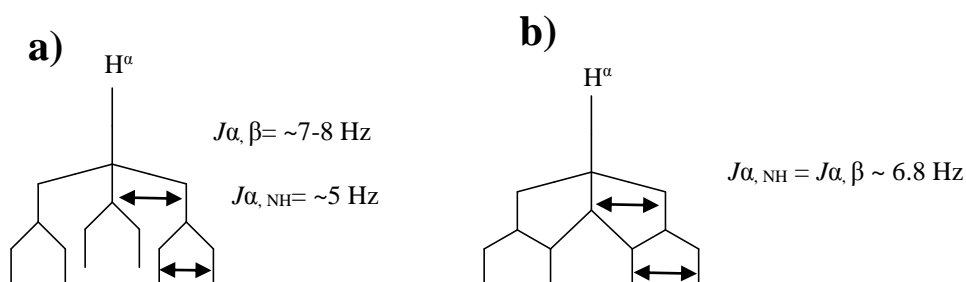


Figura 2.8 – Diagrama representativo do acoplamento entre o protão H^α e os protões H^β e NH das 4-aminoquinazolininas **93** e **125 - 130**. **(a)** Acoplamento teórico; **(b)** Acoplamento visualizado experimentalmente.

No caso do composto **93** que foi obtido através de uma hidrogenação catalítica do composto **130** com um rendimento de 98 %. Pode observar-se pela comparação de ambos os espectros de ^1H -RMN das duas moléculas o aparecimento de um singuleto a $\delta = 5.41$ ppm no espectro da molécula **93**, correspondente aos dois prótons da amina (Figura 2.9a). O espectro bidimensional HMBC mostra a interação entre os prótons da amina e os carbonos sp_2 nas posições 5 e 7 da função quinazolina (Figura 2.9b). Pela análise dos espectros de infravermelho, também se pode observar o desaparecimento da banda a 1578 cm^{-1} correspondente ao grupo nitro e o aparecimento de uma banda a 3395 cm^{-1} correspondente à amina aromática formada.

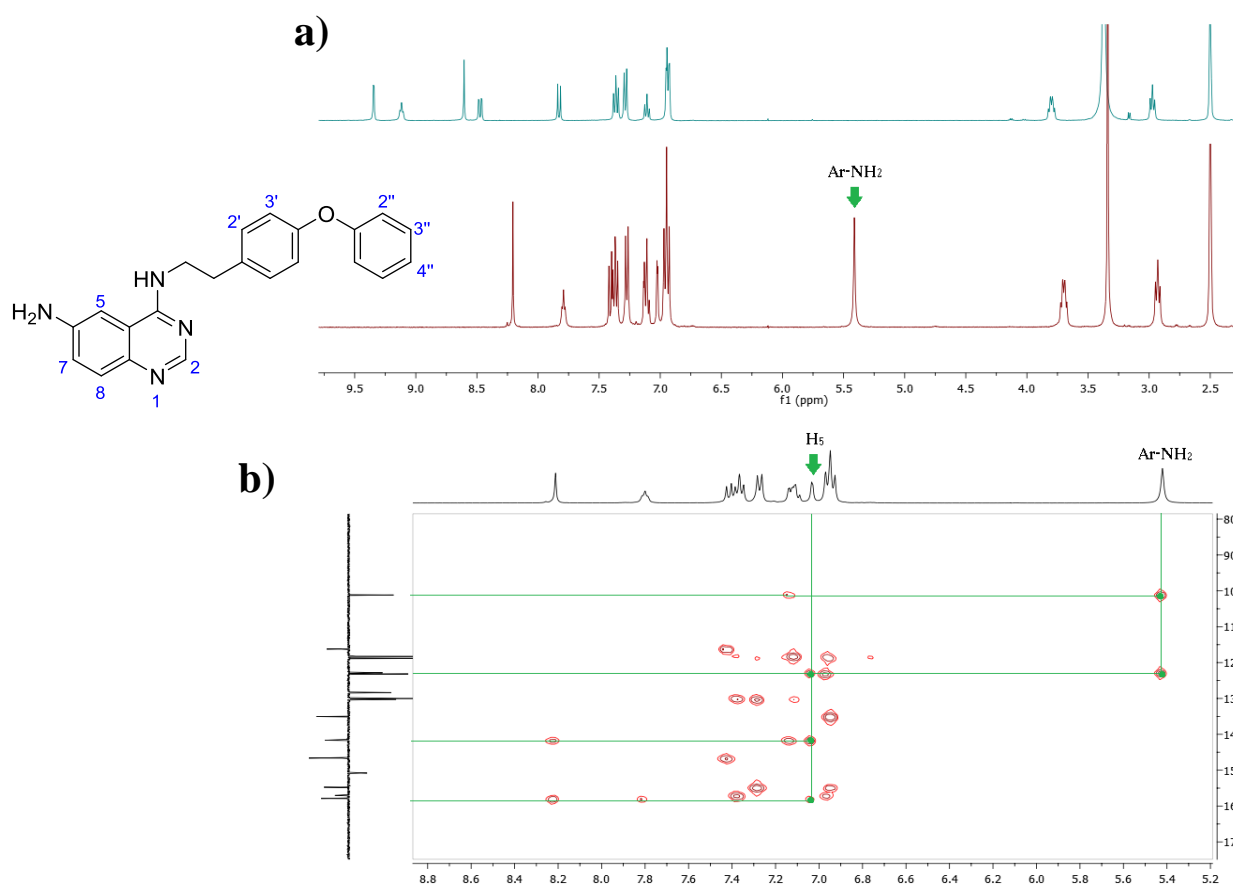


Figura 2.9 – a) Representação parcial do espectro de ^1H -RMN dos compostos **130** e **93**. Os prótons do composto **130** estão a azul e do **93** estão a vermelho **b)** Representação parcial do espectro bidimensional HMBC do composto **93**. Correlação entre os prótons da amina e os carbonos C5 e C7 e interação do próton H5 que interage com o mesmo C7 e os dois carbonos quaternários adjacentes (verde).

A identificação e atribuição dos restantes prótons dos compostos **93** e **125 – 130** foram confirmadas pelas técnicas bidimensionais COSY, HMQC e HMBC (espectros em anexo). A caracterização de todos os compostos finais **93** e **123 – 130** foi confirmada pela determinação da fórmula molecular (Análise Elemental) e por identificação do ião molecular (espectrometria de massa), tal como a presença dos principais grupos funcionais destes mesmos compostos foram analisados por espectrometria de infravermelho (capítulo 5).

Capítulo 3

*Actividade biológica das
4-Aminoquinazolinas
sintetizadas*

3.1. Actividade antimalárica *in vitro* das 4-aminoquinazolininas finais e citotoxicidade

A actividade antimalárica das 4-aminoquinazolininas finais foi testada *in vitro* no Instituto de Medicina Molecular, em Lisboa. Os ensaios biológicos permitiram avaliar a actividade destes compostos contra a fase sanguínea e hepática de *Plasmodium falciparum* 3D7 (sensível à cloroquina) e *Plasmodium berghei*, respectivamente.

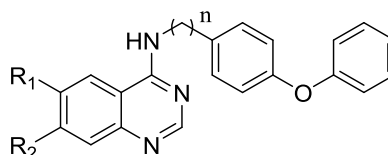
Os ensaios biológicos realizados para a fase sanguínea, foi realizada pela Unidade de Microbiologia Molecular e Infecção, que utilizou a técnica de citometria de fluxo, após prévia preparação de soluções dos compostos testados. Nesta técnica é avaliada a parasitemia celular através da adição de um corante, onde são contadas o número de partículas suspensas (tratadas com corante) em meio líquido em fluxo. A taxa de infecção é medida pela determinação da percentagem de células com fluorescência positiva em certos pontos de tempo após adição do parasita. Em tempos posteriores, a intensidade da fluorescência é uma medida eficaz do número de cópias do parasita, ou seja, o seu desenvolvimento (caso se verifique).¹⁴⁰

Quanto aos ensaios biológicos para a fase hepática, foram realizados pela Unidade de Malária, através da medição da intensidade de luminescência em hepatócitos infectados. Após ser feita a lise celular do hepatócitos, a luciferase, que é expressa no *P. berghei*, reage com substratos adicionados (luciferina) ao lisado das células, resultando na emissão de uma quantidade de luz que é proporcional à taxa de parasitemia no lisado. O corante AlamarBlue é utilizado para avaliar a confluência da célula antes da lise celular. Os resultados obtidos foram expressos em valores de IC₅₀ (concentração de fármaco que inibe 50% do desenvolvimento do parasita) e representam a média de pelo menos três ensaios experimentais (Tabela 3.1).¹⁴¹

A toxicidade *in vitro* dos compostos **93** e **123-129** foi avaliada em células mamíferas NIH3T3 (linhagem de rato) e HEK293T (linhagem humana), na Faculdade de Farmácia – Universidade de Lisboa pela Dra. Lídia Gonçalves, através de um ensaio colorimétrico que avalia a viabilidade das células. Resumidamente, as oxidoreductases celulares, dependentes de NAD(P)-H, podem, reflectir o número de células viáveis, pois são capazes de reduzir o corante MTT ao formazano correspondente, que tem cor púrpura. De seguida, através da medição da absorvância é determinada uma percentagem de viabilidade da célula, reflectindo-se numa curva de concentração-resposta. Nesta curva é determinado o valor de IC₅₀ que espelha a inibição de 50% de viabilidade das células.¹⁴² O índice de selectividade (IS) foi calculado com base nos valores de toxicidade e actividade [IC₅₀(Hek293T)/IC₅₀(*P. berghei*)].

A primaquina também foi incluída nos estudos biológicos como controlo positivo para a actividade da FH, com um IC₅₀ já descrito na literatura.⁸⁹

Tabela 3.1 Actividade antimalárica das 4-aminoquinazolininas (**93**, **ASR** e **123 - 129**) contra a fase hepática e sanguínea (*P. berghei* e *P. falciparum* 3D7, respectivamente) da infecção, as suas toxicidades em células NIH3T3 e Hek293T, peso molecular, LogP e LogS.



Composto	Substituintes			Citotoxicidade (IC ₅₀ , μM)		Actividade Antiplasmodial (IC ₅₀ , μM)			Propriedades moleculares		
	R ₁	R ₂	n	NIH3T3	Hek293T	Fase Hepática	Fase Sanguínea	IS	Peso Molecular	LogP ^b	LogS ^c
93	NH ₂	H	2	69	>100 59 ⁷⁶	0,008 0,0012 ⁷⁶	n.i. 1,17 (W2) ⁷⁶	>10000	356	4,07	- 5,34
123	H	H	0	49	>100	2,2	n.i.	>45,5	313	4,72	- 5,07
124	H	H	1	>100	>100	0,033	n.i.	>3030	327	4,48	- 5,22
ASR^a	H	H	2	67	>100	0,007	n.i.	>10000	341	4,87	- 5,43
125	Br	H	2	>100	>100	0,005	n.i.	>10000	420	5,49	- 5,75
126	Cl	H	2	30	>100	0,010	n.d.	>10000	375	5,34	- 5,68
127	OMe	H	2	>100	>100	0,031	n.d.	>3225	371	4,72	-5,36
128	H	Cl	2	>100	>100	0,013	n.d.	>7692	375	5,34	- 5,68
129	H	OMe	2	>100	>100	0,020	n.d.	>5000	371	4,73	-5,36
PQ	--	--	-	--	--	7,5	--	--	259	2,76	-3,66

^a compostos sintetizados por Ana S. Ressurreição; ^b, ^c LogP é um valor calculado do logaritmo do coeficiente de partição entre o 1-octanol e a água e LogS a solubilidade em água. Valores calculados através do software ALOGPS (<http://www.vclab.org/lab/alogps/>). n.d.: não determinado; n.i.: não inibe.

Os dados da actividade antiplasmodica mostram, com base nos valores de IC₅₀ obtidos, que os derivados da quinazolina apresentam potente actividade antimalárica, na ordem dos nanomolar (IC₅₀ < 33 nM, excepto para o composto **124**) contra a fase hepática da infecção. Também é importante referir que a principal característica destes compostos é o facto de serem extremamente selectivos para a fase hepática do ciclo de vida do parasita, pois como se pode verificar na Tabela 3.1, nenhum dos compostos testados inibe a fase sanguínea. A toxicidade *in vitro* também reflecte o facto destes compostos serem bastante promissores, uma vez que na sua generalidade não são tóxicos em células mamíferas (NIH3T3 e HEK293T).

Com base nos valores de IC₅₀ pode-se evidenciar as seguintes relações de estrutura-actividade. Relativamente ao comprimento da cadeia alquílica lateral é de notar que para compostos com cadeias metilénicas de dois carbonos (**ASR** – 7 nM) a actividade antiplasmodica é 5 vezes superior à do composto com um carbono na cadeia (**124** – 33 nM). Por sua vez, o composto com apenas um carbono na cadeia alquílica é mais activo do que o composto sem carbonos nessa mesma cadeia (**123** – 2200 nM). Conclui-se então que neste tipo de derivados da quinazolina, cadeias alquílicas laterais maiores (2C) apresentam 5 e 314 vezes melhor actividade do que cadeias laterais com

menos carbonos (1C e 0C, respectivamente). Quanto aos ensaios de toxicidade, estes três compostos não demonstraram citotoxicidade em células de linhagem humana, mas os compostos **123** e **ASR** (IC_{50} (NIH3T3) = 49 e 67 μ M, respectivamente) exibiram alguma toxicidade em células de rato. No entanto, destes três compostos, o que apresenta maior actividade para a FH (**ASR**) tem índices de selectividade muito grandes em ambas as linhagens celulares ($IS = >10000$), minimizando assim os problemas inerentes à toxicidade.

O próximo passo foi estudar o comportamento da actividade antiplasmodica na presença de grupos dadores (-OMe e -NH₂) e atractores (-Br e -Cl) de electrões nas posições 6 e 7 da função quinazolina. Através da análise da Tabela 3.1 foi possível verificar que a substituição nas posições 6 e 7 é muito bem tolerada, fornecendo valores de IC_{50} numa gama que varia entre os 5 – 31 nM.

Através da substituição na posição 6 da função quinazolina, é possível afirmar que tanto a introdução de grupos atractores como dadores de electrões fornecem uma elevada actividade para a fase hepática do ciclo do parasita. No caso de dadores de electrões, os compostos **93** (6-NH₂) e **127** (6-OMe) apresentaram IC_{50} de 8 e 31 nM, respectivamente. Comparando com os valores obtidos no *screening* (**93**, IC_{50} = 12 nM, Tabela 3.1), a quinazolina **93** sintetizada apresenta actividade muito semelhante para a fase hepática (IC_{50} = 8 nM) e é inactiva na fase sanguínea, conseguindo-se assim, uma reproductibilidade do valor de actividade (na FH) do *screening*. No entanto, apresenta toxicidade nas células de rato. Esta toxicidade pode ser devido à presença de amins aromáticas, que estão reportadas por bloquear os canais hERG (relação com a insuficiência cardíaca).^{143,144} Por sua vez, a introdução de grupos atractores de electrões (-Br e -Cl) na posição 6, demonstrou ser bastante benéfica para a actividade biológica. O composto **125** apresentou um IC_{50} = 5 nM, revelando ser a molécula mais activa deste estudo de SAR, não revelando também quaisquer problemas de toxicidade em células de rato e humanas ($IS > 10000$). Por outro lado, a substituição com cloro (**126**) também revelou uma actividade muito boa (IC_{50} = 10 nM), mas demonstrou alguma toxicidade em células de rato. Apesar disso, o elevado índice de selectividade ($IS > 3000$) para a fase hepática atenua estes problemas de toxicidade.

No que toca à substituição na posição 7 da função quinazolina, foram sintetizados dois compostos, o composto **129** com o grupo electrodador metoxilo (IC_{50} = 20 nM) e o composto **128** (IC_{50} = 13 nM) com o grupo electroatractor cloro. Ambos revelaram excelentes actividades *in vitro*, no entanto, é notória, mais uma vez, a melhor tolerância de grupos atractores de electrões.

Com isto, apesar da diferença de valores de IC_{50} não ser significativa, é relevante realçar que substituições com grupos electroatractores nas posições 6 e 7 são mais favoráveis à actividade antiplasmodica, do que substituições com grupos dadores de electrões. Por outro lado, a

substituição destes grupos electroatractores é favorecida na posição 6 face à posição 7 da função quinazolina – Tabela 3.1.

Na figura 3.1 encontram-se esquematizadas as conclusões do estudo de SAR dos compostos finais obtidos:

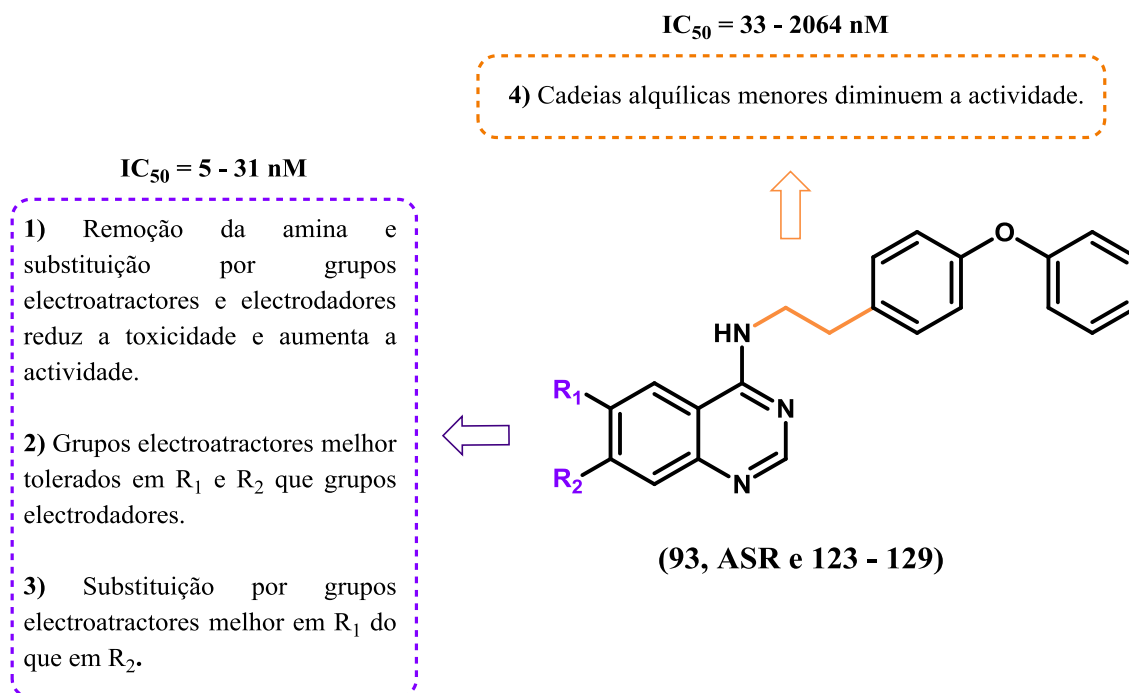


Figura 3.1 – Estudo de relação estrutura-actividade dos compostos 93, ASR e 123 – 129.

Como já foi referido anteriormente, foi usada a primaquina como controlo positivo destes estudos. Através da tabela apresentada é possível afirmar que, à excepção do composto **123**, todos os outros apresentam uma actividade selectiva para a FH do ciclo de vida do parasita 227 – 1500 vezes superior à do fármaco que é usado actualmente no combate da fase hepática da doença. Isto sugere, mais uma vez, que estes compostos derivados da quinazolina são bastantes promissores.

Relativamente às suas propriedades moleculares, os compostos da Tabela 3.1, na sua generalidade, seguem as regras de Lipinski¹⁴⁵, pois todos os compostos têm uma massa molecular inferior a 500 g/mol e não apresentam mais de cinco dadores de ligações de hidrogénio nem mais de dez aceitadores de ligações de hidrogénio. Quanto à sua lipofília (LogP) todos os compostos apresentam razoáveis valores de lipofília, o que os torna capazes de serem permeáveis às membranas biológicas. No entanto, na presença de grupos electroatractores o valor de LogP ultrapassa os 5 (valor limite segundo as regras de Lipinski), podendo estar aqui uma futura optimização estrutural por fazer.

Capítulo 4

*Síntese dos componentes da
sonda molecular fluorescente*

4.1 A sonda molecular fluorescente

Como já foi exibido anteriormente, pela actividade e pelos estudos de SAR, todas as 4-aminoquinazolininas finais, **93** e **123 - 129**, são bastante activas contra a FH do parasita. No entanto, apesar de serem compostos bastante promissores não é conhecido o seu mecanismo de acção nem o alvo molecular onde estes compostos actuam. Assim, achámos interessante o desenvolvimento de “ferramentas” químicas adequadas para o estudo mais detalhado do mecanismo de acção deste tipo de compostos. A principal “ferramenta” química escolhida foi uma sonda molecular baseada na fluorescência e em técnicas biortogonais que tendem a aumentar essa mesma fluorescência, sendo inertes ao sistema biológico. A análise retrossintética da sonda está representada no Esquema 4.1.

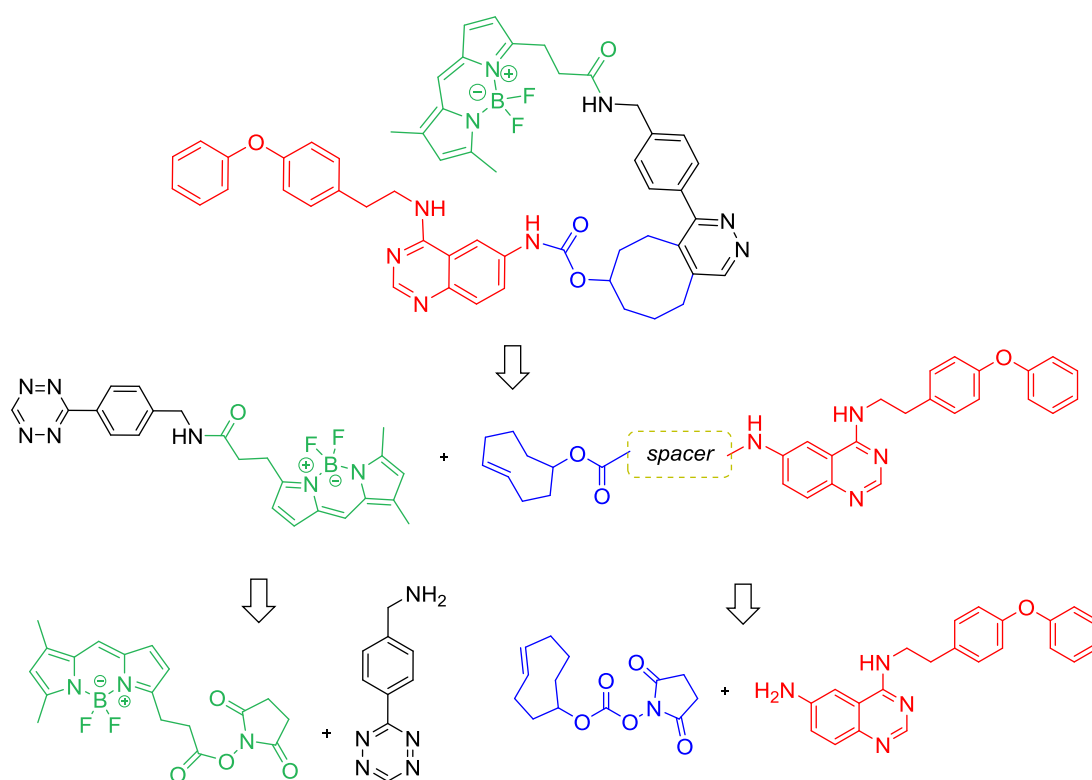
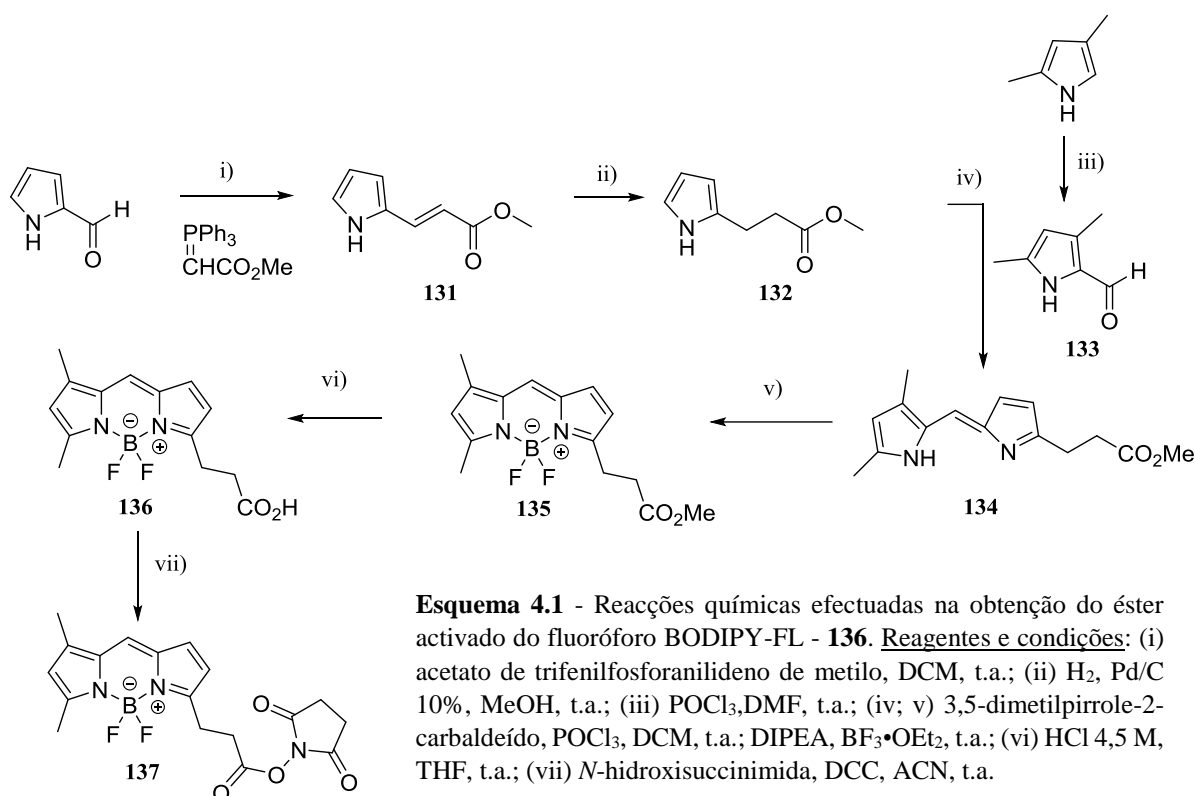


Figura 4.1 – Análise retrossintética para a síntese da sonda molecular “turn-on”.

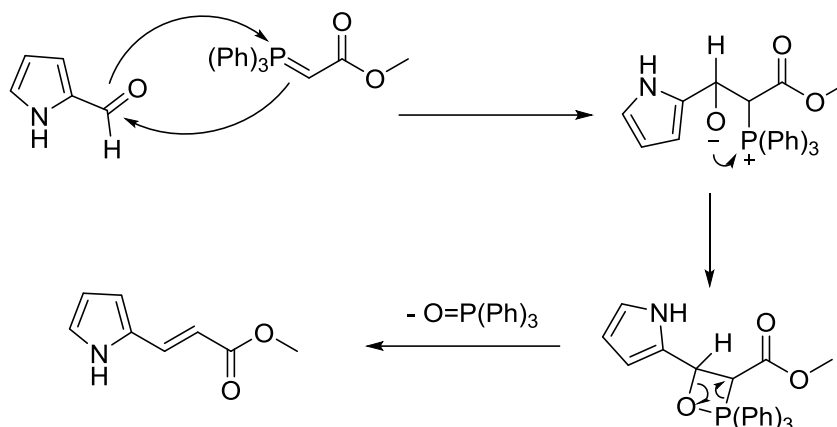
Tal como referido nos objectivos deste trabalho, o desenvolvimento destas “ferramentas” químicas consiste na síntese de uma sonda molecular, que, acoplada à 4-aminoquinazolinina **93** (com e sem espaçador), à partida, irá concentrar-se em maior quantidade no alvo molecular onde actua. Assim, a síntese desta sonda molecular consiste numa tetrazina acoplada a um fluoróforo (BODIPY-FL), que reage biortogonalmente através de uma reacção Diels-Alder inversa, dentro da célula com o *trans*-cicloocteno (TCO) conjugado com a 4-aminoquinazolinina **93**. Para todos os intervenientes desta sonda foram aplicadas metodologias de síntese descritas na literatura, no entanto, em alguns casos, os objectivos traçados, não foram alcançados.

4.1.1. Síntese do Fluoróforo BODIPY-FL



A síntese do fluoróforo escolhido (BODIPY-FL) com vista a incorporação na sonda molecular foi realizada, com sucesso, em sete passos. A grande maioria dos intermediários (à excepção do intermediário **134**) foram isolados por purificação adequada e identificados por espectroscopia de ¹H-RMN.

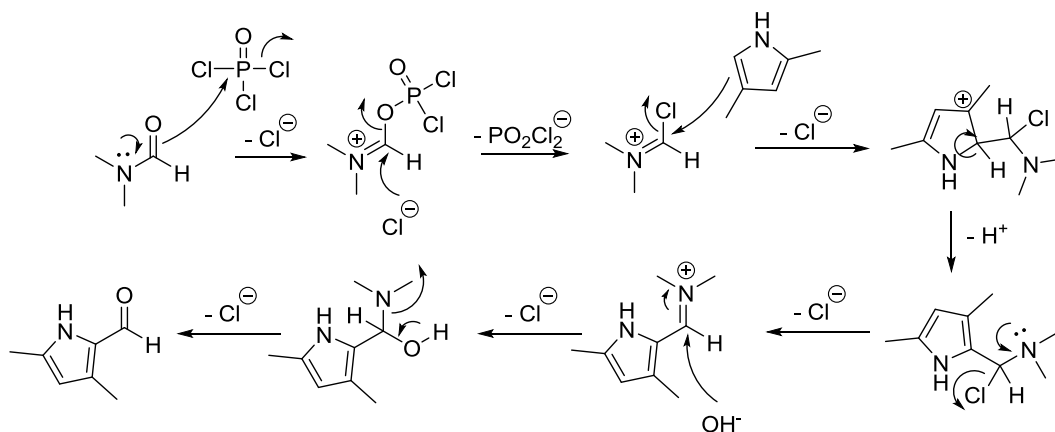
O primeiro passo com vista à obtenção do acrilato **131**, consistiu numa reacção de Horner–Wadsworth–Emmons, entre o 1*H*-pirrole-carbaldeído comercial e um fosforano trifenílico estável (acetato de trifenilfosforanilideno de metilo), segundo o método descrito por Giebler *et al.*¹⁴⁶ (passo *i*, Esquema 4.1). O mecanismo da reacção, representado no Esquema 4.2, consiste na adição nucleofílica do carbanião do ileto de fósforo ao carbono carbonílico do aldeído, formando a chamada betaína (espécie zwitteriónica) que rapidamente cicliza, formando um intermediário reaccional cíclico de quatro membros (oxafosfetano). No passo final da reacção liberta-se óxido de trifenilfosfina obtendo-se o acrilato **131** com 80 % de rendimento. Os dados ¹H-RMN, onde se verificam a presença de todos os protões, estão de acordo com a literatura.¹⁴⁶ No entanto, é de realçar que os protões da ligação dupla desdobram-se, ambos, em dupletos devido ao acoplamento entre si e com constantes de acoplamento viciais na ordem dos 16 Hz, como era de esperar, devido à isomeria *trans* da dupla ligação. O ponto de fusão (60 – 62° C) também foi determinado, estando de acordo com a literatura (59 - 62° C).¹⁴⁷



Esquema 4.2 - Mecanismo geral da reacção de Horner-Wadsworth-Emmons, na presença de um fosforano, para obter o intermediário **131**.

Uma vez obtido o acrilato **131**, efectuou-se a redução da ligação dupla através de uma hidrogenação catalítica com paládio (Pd/C-10%) - passo *ii*; Esquema 4.1, segundo procedimentos descritos na literatura,¹⁴⁶ O composto **132** foi obtido com 96 % de rendimento, tendo sido identificado por ¹H-RMN comprovando-se a redução da ligação dupla pela presença de dois tripletos correspondentes aos prótons dos carbonos metilénicos (capítulo 6.2.5.3).

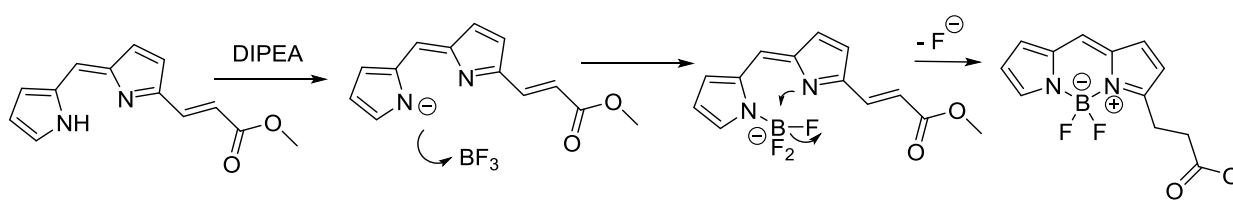
De seguida, para a continuação do método desenvolvido para o BODIPY-FL, foi necessária a síntese de um reagente paralelo à síntese do fluoróforo, descrito por Antina *et al.*¹⁴⁸ O 3,5-dimetil-1*H*-pirrole-2-carbaldeído (**133**) necessário para a síntese do fluoróforo foi obtido através da reacção de Vilsmeier-Haack entre o comercial 2,4-dimetil-1*H*-pirrole e POCl₃, usando *N,N*-dimetilformamida como catalisador da formilação (passo *iii*, Esquema 4.1). Relativamente ao mecanismo da reacção (Esquema 4.3), baseia-se, inicialmente, na formação, *in situ*, de uma espécie altamente electrofílica, um sal de imínio, devido à reacção entre o oxidocloreto de fósforo e a *N,N*-dimetilformamida. Este intermediário reage posteriormente com o pirrole para formar uma amina clorada, que, é hidrolisada a aldeído em meio alcalino, por adição de KOH.



Esquema 4.3 - Mecanismo geral da reacção de formilação Vilsmeier-Haack, para obter o intermediário **133**.

A reacção é altamente regioseletiva, pelo anel pirrólico apresentar uma densidade electrónica muito superior, por exemplo, à de um anel benzénico e a posição C2 formar um estado de transição mais energético que a posição C4 devido ao impedimento estereoquímico do dois grupos metilo. O aldeído **133** foi isolado com 82 % de rendimento, sendo possível identificar o protão correspondente ao aldeído a campo baixo, com um desvio químico de $\delta = 9,46$ ppm (capítulo 6.2.5.1.)

De seguida, foi obtido o composto borado **135** em dois passos sintético. Inicialmente, deu-se a reacção entre o propanoato **132** e o aldeído **133** em DCM (passo iv, Esquema 4.1). A geração do intermediário **134** foi realizada com sucesso, sem a formação de produtos secundários, permitindo assim, a adição de DIPEA e $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ com vista a formação da molécula **135** (passo v, Esquema 4.1). Esta reacção é interessante do ponto de vista mecanístico devido à introdução do átomo de boro (Esquema 4.4). Neste caso, a base adicionada é responsável por retirar o protão do átomo de azoto, tornando-o mais nucleófilo para atacar o átomo de boro que tem uma orbital vazia, e assim, capacidade para aceitar os electrões do azoto. Com isto, os electrões disponíveis pelo outro átomo de azoto presente também atacam o átomo de boro, expulsando assim, um átomo de flúor (bom grupo abandonante). O átomo de boro suporta muito bem a carga negativa devido à presença dos átomos de flúor, pois estes são extremamente electronegativos, tornando a ligação B-F bastante polarizada. O composto **135** foi obtido com 72 % de rendimento e identificado por ^1H -RMN e, de acordo com a literatura, verificou-se uma forte fluorescência no UV do composto solubilizado, devido à intensa conjugação existente na molécula. O ponto de fusão também foi determinado ($79 - 81^\circ \text{C}$) e está de acordo com a literatura ($76 - 78^\circ \text{C}$).¹⁴⁶



Esquema 4.4 - Mecanismo geral da reacção de boração para obter o intermediário **135**.

O BODIPY-FL foi então obtido com 52 % de rendimento por hidrólise ácida do composto **135**. O ácido em questão foi caracterizado através de técnicas espectroscópicas monodimensionais (^1H -RMN e ^{13}C -RMN) e bidimensionais (HMQC e HMBC). Através do espectro de protão é possível ver o aparecimento de um singuleto largo a $\delta = 12,3$ ppm, indicando a presença do ácido carboxílico e o respectivo sucesso da reacção de hidrólise. O ponto de fusão foi determinado ($186 - 189^\circ \text{C}$) e pela análise do espectro de infravermelho foi possível identificar a banda relativa ao

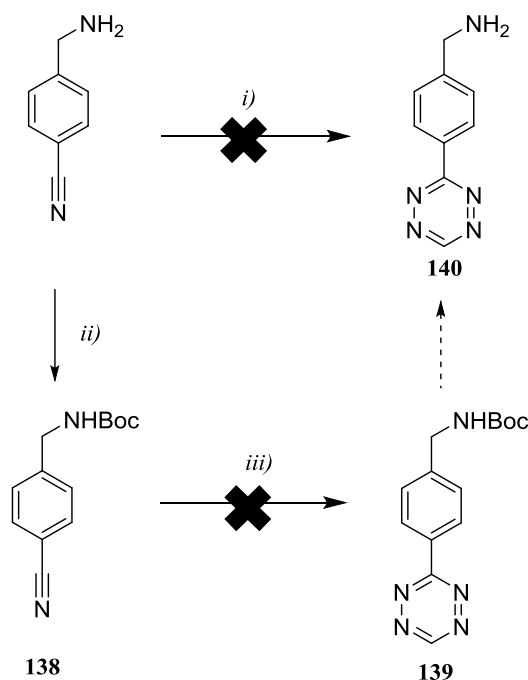
carbonilo a 1710 cm^{-1} e do grupo hidroxilo a 3447 cm^{-1} . Por espectrometria de massa obteve-se o pico base para o composto: $[M + Na]^+$ a m/z 315,12. Estes resultados estão de acordo com os dados reportados na literatura.¹⁴⁶

O último passo sintético consistiu na activação do ácido carboxílico do BODIPY-FL **136** formando o éster **137**. O método utilizado foi idêntico à síntese dos compostos **117** - **122**, mas usando como agente de acoplamento o DCC que é usado para activar o ácido carboxílico, deixando o carbono carbonílico mais electrofílico para ser atacado pela *N*-hidroxisuccinimida (passo *vii*; Esquema 4.1). O éster activado **137** foi isolado com 47 % de rendimento, tendo sido caracterizado por ^1H -RMN, confirmando-se a presença de um singuleto a $\delta = 2,84$ ppm, correspondente aos quatro prótons da succinimida (capítulo 6.2.5.6), bem como determinado o seu ponto de fusão ($158 - 160^\circ\text{C}$).

4.1.2. Síntese do derivado da tetrazina

A próxima etapa do trabalho foi uma tentativa de síntese com vista a obtenção de um derivado da tetrazina, a 3-(*p*-benzilamino)-1,2,4,5-tetrazina **140**. Como já foi referido anteriormente, a tetrazina é um componente fulcral desta sonda molecular, visto que vai fazer parte da reacção biortogonal com o TCO. O objectivo da obtenção deste derivado da tetrazina é fazê-lo reagir com o éster activado do BODIPY-FL **137** (Esquema 4.1) para que, posteriormente, se coloquem as condições necessárias à reacção biortogonal intracelular. Nesta metodologia, o derivado da tetrazina irá funcionar como um *quencher*, ou seja, vai fazer diminuir a intensidade da fluorescência natural do BODIPY-FL.^{120,149}

A primeira reacção efectuada, com o intuito de formar directamente o anel de tetrazina a partir do grupo nitrilo teve como base a reacção entre o 4-(aminometil)benzonitrilo comercial, enxofre sublimado, a hidrazina monohidratada e o acetato de formamidina (passo *i* – Esquema 4.5). Esta síntese foi adaptada do método descrito por Devaraj *et al.*¹¹⁹, mas, neste caso a reacção para além de não ser completa, não resultou no produto esperado, pois por ^1H -RMN não se verifica a presença de um singuleto a campo baixo, correspondente ao próton do anel de tetrazina. É de realçar que segundo o protocolo descrito por Devaraj *et al.*¹¹⁹, a hidrazina usada é anidra, ao invés do passo *i*), onde foi usada hidrazina monohidratada.



Esquema 4.5 - Metodologia usada para obter a 3-(p-benzilamino)-1,2,4,5-tetrazina **140**. (i) Acetado de formamidina, S₂, (NH₂)₂•H₂O, t.a.; (ii) Boc₂O, NaOH, H₂O, t.a.; (iii) acetato de formamidina, Zn(OTf)₂, (NH₂)₂•H₂O, solvente e temperatura – Tabela 4.1.

Uma vez que não se conseguiu sintetizar a tetrazina pretendida num só passo, tentou-se a sua síntese através de outra metodologia, que consistiu, primeiro na protecção da amina primária livre e, de seguida, a síntese do anel de tetrazina na presença de um catalisador (triflato de zinco).

A protecção do grupo amina foi realizada através de métodos já referidos anteriormente, com um protocolo descrito por Lang *et al.*,¹⁵⁰ com o grupo *tert*-butilcarbamato na presença de hidróxido de sódio em água (passo *ii*, Esquema 4.5). A amina protegida **138** foi isolada sem purificação necessária com 62 % de rendimento. A obtenção do produto foi confirmada através de ¹H-RMN devido à presença de um singuleto correspondente aos 9 prótons do grupo *tert*-butilo a $\delta = 1,46$ ppm.

No passo seguinte com vista à síntese do anel de tetrazina (passo *iii*, Esquema 4.5) foram realizadas várias tentativas, que estão representadas na Tabela 4.1. As tentativas 1 e 2 foram realizadas na presença do material de partida (composto **138**), de acetato de formamidina (CH₄N₂•C₂H₄O₂), de hidrazina monohidratada em 1,4-dioxano e um catalisador metálico, o triflato de zinco. A grande diferença destas tentativas para o passo *i* do Esquema 4.5 é a presença do sal divalente de zinco utilizando uma catálise homogénea. Teoricamente, a adição deste tipo de catalisadores promove a reacção devido à coordenação com o nitrilo e/ou hidrazina, pois os iões metálicos são conhecidos por activar este tipo de grupos funcionais para uma posterior adição nucleófila, tal como descrito por Lang *et al.*¹⁵⁰ No entanto, em nenhuma das tentativas foi obtido o produto desejado.

Tabela 4.1 – Condições reaccionais das tentativas do passo *iii*) para obter o composto **139**.

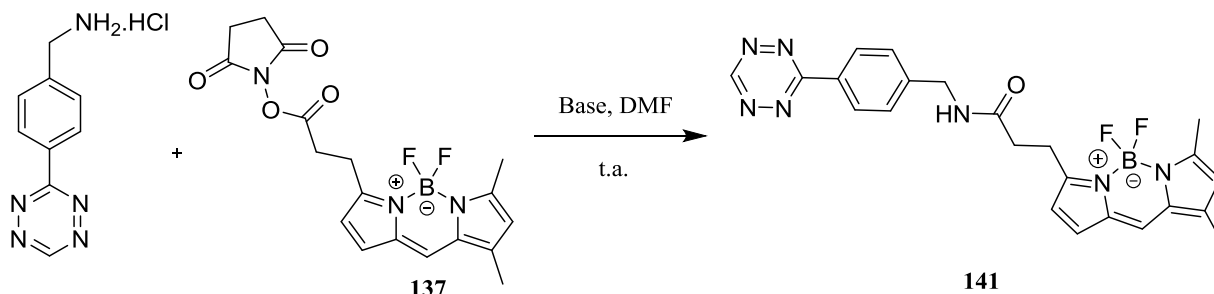
Passo <i>iii</i>)	Material de partida (mg, equiv)	CH ₄ N ₂ •C ₂ H ₄ O ₂ (mg, equiv)	Zn(OTf) ₂ (mg, equiv)	(NH ₂) ₂ •H ₂ O (μL, equiv)	Co-solvente (M)	Tempo e Temperatura (h, ° C)
Tentativa 1	80 mg, 1 equiv	344 mg, 10 equiv	63 mg, 0,5 equiv	801 μL, 48 equiv	1,4-Dioxano, 0,85 M	16 h, 60° C
Tentativa 2	54 mg, 1 equiv	194 mg, 10 equiv	71 mg, 1 equiv	452 μL, 48 equiv	1,4-Dioxano, 0,85 M	16 h, 60° C
Tentativa 3	50 mg, 1 equiv	224 mg, 10 equiv	78 mg, 1 equiv	660 μL, 60 equiv	DMF, 0,66 M	48 h, 30° C
Tentativa 4	50 mg, 1 equiv	224 mg, 10 equiv	78 mg, 1 equiv	660 μL, 60 equiv	DMF, 0,66 M	48 h, 30° C

A terceira tentativa foi seguida por um protocolo desenvolvido por Yang *et al.*¹⁵¹, onde a principal alteração foi a alteração do co-solvente, a temperatura e o tempo de reacção. No entanto, mais uma vez, apesar do material de partida ser consumido, não foi obtido o produto desejado. A quarta tentativa do passo *iii*) do Esquema 4.5 foi realizada nas mesmas condições da terceira tentativa mas com a hidrazina seca com crivos molecular 3Å activados. Mais uma vez, o produto obtido não foi o desejado.

Devido ao sucessivo insucesso na obtenção da tetrazina e à falta de tempo, decidiu-se obter a tetrazina pretendida via comercial e continuar a síntese dos restantes componentes da sonda molecular.

4.1.3. Acoplamento Tetrazina-BODIPY-FL

O acoplamento entre o éster activado do BODIPY-FL e a 3-(*p*-benzilamino)-1,2,4,5-tetrazina comercial foi efectuado seguindo o protocolo descrito por Devaraj *et al.*¹²⁰ (Esquema 4.6).



Esquema 4.6 - Reacção química efectuada na tentativa de obter a molécula **141**. Nota: As bases usadas estão reportadas na Tabela 4.2.

Como se pode ver na Tabela 4.2, a reacção foi inicialmente tentada numa escala de 5 mg de tetrazina hidrociorada com a adição de 8 equivalentes de trietilamina. No entanto, a complexidade da mistura obtida e quantidade diminuta não permitiram fazer a identificação dos produtos (tentativa 1).

Tabela 4.2 – Condições reaccionais das tentativas do Esquema 4.6

	BODIPY (mg, 1 equiv)	Tetrazina•HCl (mg, 4 equiv)	Base (μL, 8 equiv)	Tempo de reacção (h)	Produto
Tentativa 1	2,4 mg	5 mg	Et ₃ N (24 μL)	24 h	-
Tentativa 2	5,2 mg	10 mg	DIPEA (19 μL)	23 h	impuro

A segunda tentativa, foi realizada numa escala de 10 mg de tetrazina, e alterou-se a base. Desta vez, na presença de DIPEA, a reacção foi completa formando-se vários produtos na reacção. O espectro de ¹H-RMN está representado na Figura 4.2a e parece indicar a presença do produto desejado. No entanto, devido à falta de tempo e à difícil optimização do processo de purificação não foi possível isolar e caracterizar o produto.

Uma análise detalhada do espectro de ¹H-RMN mostra a presença de um sinal a campo baixo com $\delta = 10.2$ ppm característico do protão correspondente ao anel de tetrazina, estando de acordo com os desvios químicos reportados na literatura.¹⁵¹ Os sinais a $\delta = 7.49$ e $\delta = 7.19$ ppm, que integram, ambos, para dois protões, desdobram-se em dupletos, sugerindo que pertencem aos hidrogénios do anel de benzeno ligado à tetrazina. Tal é confirmado pelo espectro bidimensional COSY onde se verifica o acoplamento entre os dois (Figura 4.2b). Também é possível verificar a

presença dos grupos metilo a $\delta = 2.23$ e $\delta = 2.01$ ppm pertencentes ao BODIPY-FL, tal como apurar a existência dos prótons dos $-\text{CH}_2$ da cadeia alquílica do fluoróforo que acoplam entre si, como se pode ver no espectro de COSY. No entanto, para estes últimos nota-se claramente a presença de impurezas devido à incorreta integração destes sinais. Os quatro prótons aromáticos referentes ao fluoróforo também são preceptíveis (Figura 4.2a), tal como os prótons do grupo $-\text{CH}_2$ da tetrazina a $\delta = 4.43$ ppm que pelo espectro de COSY, acoplam com o sinal a $\delta = 6.30$ ppm (possivelmente o próton da amida).

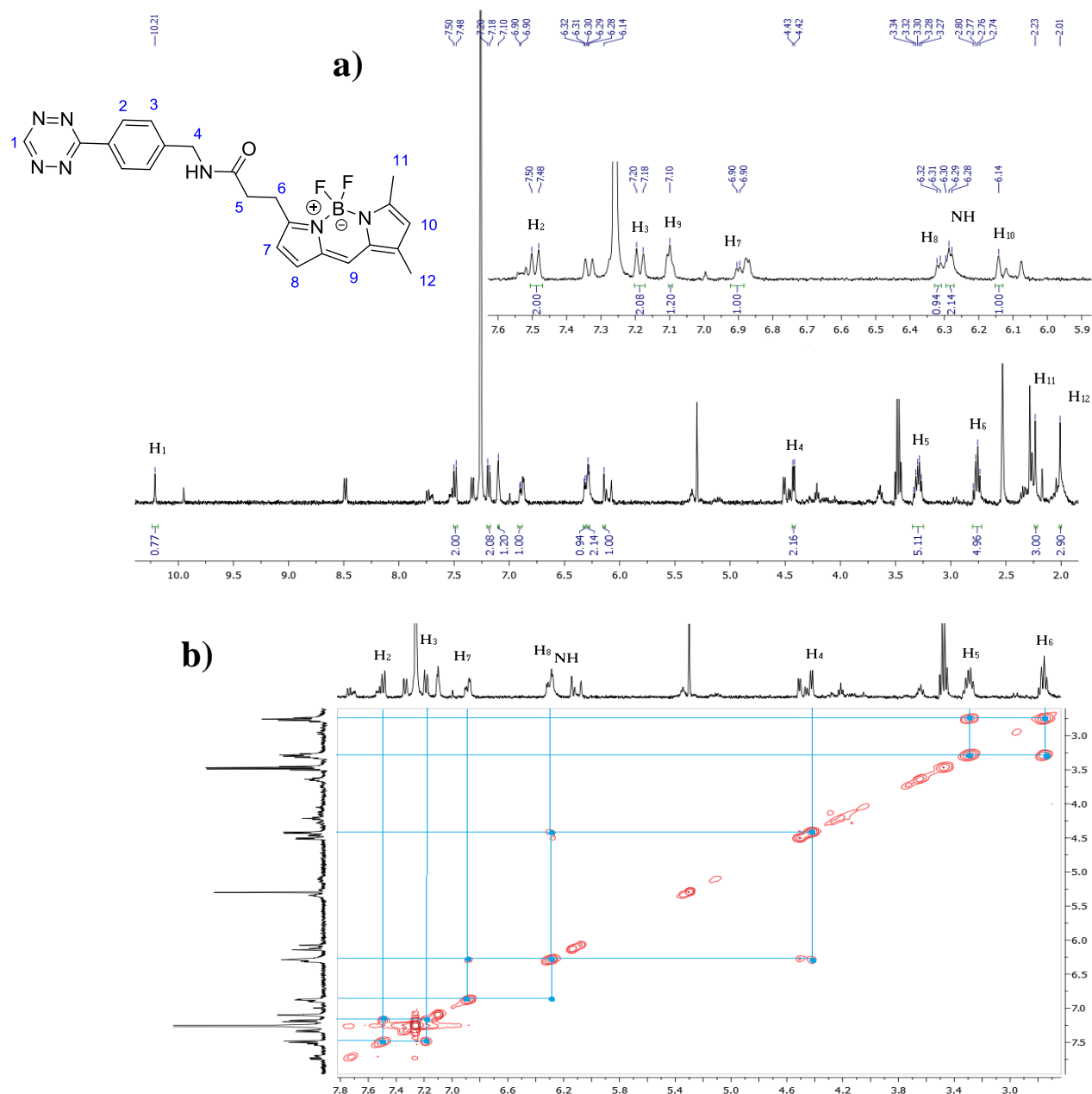
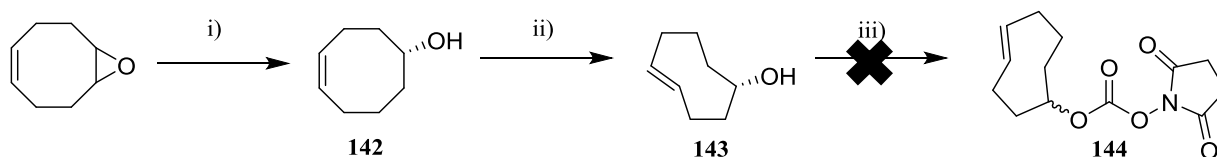


Figura 4.2 – a) Representação parcial do espectro de ^1H -RMN da tentativa 2 da Tabela 4.2. **b)** Representação parcial do espectro bidimensional COSY com possíveis interações entre prótons da molécula **141**.

4.1.4. Síntese do éster activado do *trans*-cicloocteno (TCO)

Como já foi mencionado no capítulo 1, o TCO é importante para a sonda molecular devido à sua reacção biortogonal eficaz e eficiente que realiza com o anel de tetrazina (constantes cinéticas elevadas).^{112,119} Assim, foi delineada uma metodologia de síntese (Esquema 4.7) direccionado à síntese do éster activado do TCO, para que posteriormente, fosse acoplado ao fármaco (quinazolina) em estudo (Figura 4.1).



Esquema 4.7 - Tentativa de síntese do éster activado do TCO **144**. (i) $\text{LiAlH}_4/\text{THF}$ 1M, THF, t.a.; (ii) Benzoato de metilo, éter/*n*-hexano (9:1) 0,015 M, fotólise, t.a.; (iii) CDS, base, ACN, t.a.

O primeiro passo sintético consistiu na formação do *cis*-cicloocten-4-ol através do ataque nucleófilico de um ião hidreto, proveniente do LiAlH_4 , ao epóxido (5,6-epoxicicloocteno) em THF. As condições desta reacção foram adaptadas de um protocolo descrito por Hillmyer *et al.*¹⁵² (passo *i*, Esquema 4.7), de onde resultou o composto **142** com 89 % de rendimento, sendo que o espectro de ^1H -RMN do composto **142** está de acordo com literatura,¹⁹⁹⁵ sendo de realçar que o sinal que integra para dois prótons a campo mais baixo corresponde, sem dúvidas, aos dois prótons da ligação dupla, enquanto que o sinal a $\delta = 3,81$ ppm é referente ao próton do carbono ligado ao grupo funcional hidroxilo.

O passo sintético seguinte consistiu na isomerização da ligação dupla, passando da conformação relativa *cis* para *trans*. A reactividade incomum e a estrutura quiral bem definida do TCO faz com que este seja bastante atractivo em reacções sintéticas onde a estereoquímica seja controlada. O TCO tem um plano quiral bem definido, sendo a conformação de “coroa” a mais estável, com o grupo hidroxilo em posição equatorial.¹⁵³ Quanto ao ângulo de torção da ligação dupla é mais acentuado na conformação de “coroa”, e como consequência a orbital HOMO é de elevada energia. A reacção de isomerização é bastante peculiar devido à metodologia usada, que consiste na isomerização fotoquímica directa da dupla ligação, sem interferir com a restante molécula. As condições da reacção (passo *ii*; Esquema 4.7) foram adaptadas de um protocolo desenvolvido por Royzen *et al.*, onde o isómero *trans* complexa selectivamente com um metal (prata).¹⁵³ A reacção consiste na fotoirradiação (254 nm) da solução do isómero *cis* **143** e benzoato de metilo em éter/*n*-hexano (9:1). Durante a fotoirradiação a mistura reaccional é bombeada através

de um fluxo contínuo que passa por uma coluna de sílica impregnada com nitrato de prata. Devido à sua selectividade para metais, o isómero *trans* fica retido na sílica de nitrato de prata, ao invés do isómero *cis* que é continuamente eluído, cerca de 7 horas (Figura 4.3b). No final da reacção foi obtida uma mistura de diastereoisómeros (Figura 4.3a) com um rendimento global de 68 %, sendo que a sua identificação estrutural por ^1H -RMN está de acordo com a literatura.¹⁵³

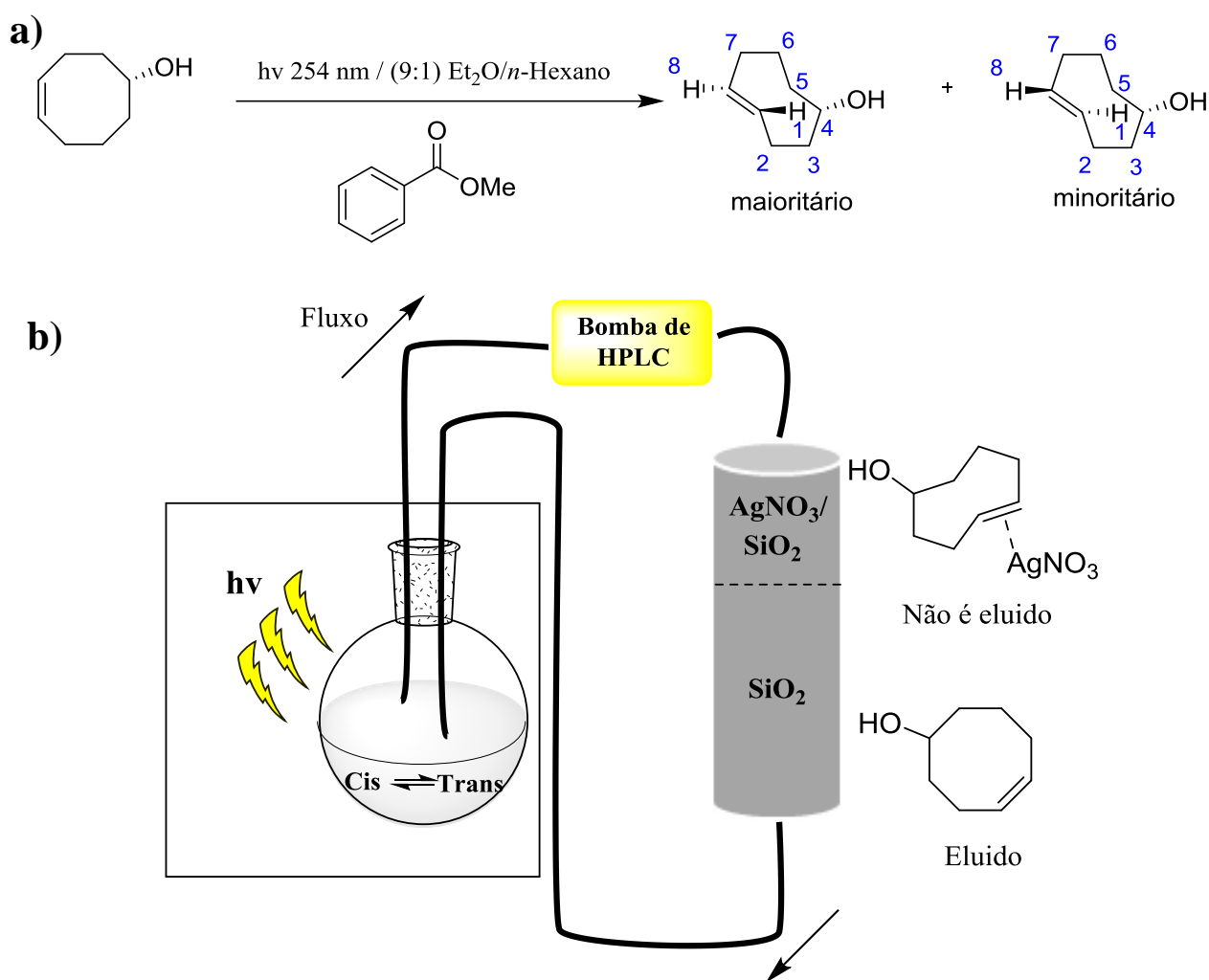


Figura 4.3 a) Esquema reaccional da fotólise. **b)** Representação esquemática do sistema em contínuo da reacção de fotólise em (a)

O último passo do esquema sintético teve como base obter um éster activado do TCO (**144**) para que, mais tarde, se realizasse a reacção com as quinazolinas pretendidas. A reacção foi realizada através de um método descrito por Devaraj *et al.*¹¹⁹, onde a uma mistura do TCO **143** e base em ACN, é adicionado o carbonato de *N,N'*-disuccinimido (CDS). O mecanismo reaccional é bastante simples, pois compreende a adição de base para tornar o hidroxilo do TCO **143** mais nucleofílico, facilitando o ataque no carbono carbonílico mais electrofílico do CDS. No entanto, apesar de terem sido efectuadas várias tentativas, não se conseguiu reproduzir a síntese reportada na literatura.¹¹⁹

A Tabela 4.3 resume as condições reacionais e resultados obtidos durante as várias tentativas, não se tendo obtido em nenhum caso o produto desejado. No entanto, após analisar os espectros de todas as tentativas, o padrão dos sinais desses mesmos prótons indicam uma isomeria *cis*, o que se supõe que de alguma maneira o composto pode ter isomerizado durante a reacção. É de realçar que o padrão espectral dos prótons correspondentes à ligação dupla varia dependendo da conformação relativa (a constante de acoplamento é maior na conformação *trans*), permitindo a identificação dos isómeros.

Tabela 4.3 – Condições reacionais das tentativas do passo iii) do Esquema 4.7.

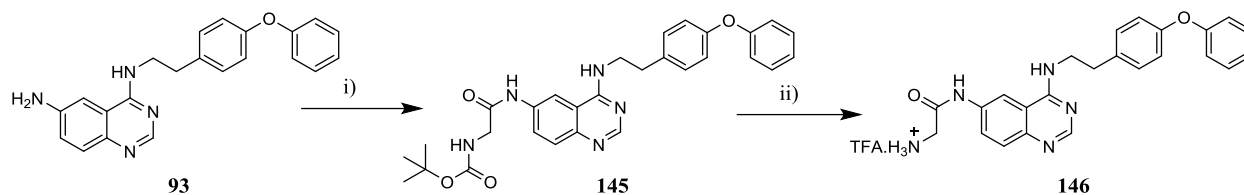
Passo iii)	TCO (mg, 1 equiv)	CDS (mg, 2,5 equiv)	Base (mg, \times equiv)	Tempo de reacção (h)	Produto
Tentativa 1	21 mg	107 mg	Et ₃ N (84 μ L, 3,6 equiv)	48 h	-
Tentativa 2	60 mg	305 mg	DIPEA (300 μ L, 3,6 equiv)	44 h	-
Tentativa 3	12 mg	61 mg	Et ₃ N (15 μ L, 1,1 equiv) + (15 μ L, 1,1 equiv)	40 h	-

Apesar disto, a escassez de tempo, não permitiu efectuar mais reacções noutras condições, no sentido de obter no sentido de obter o produto desejado.

4.1.5. Síntese das quinazolininas para a sonda molecular

A quinazolinina escolhida para acoplar à sonda molecular, com o intuito de desvendar mais informações acerca do mecanismo de acção deste tipo de compostos na fase hepática da malária, foi a quinazolinina identificada pelo *screening* fenotípico (**93**).

No entanto, como já foi dito anteriormente, a quinazolinina **93** tem por base ser acoplada ao TCO, que por sua vez irá reagir biortogonalmente com a tetrazina via reacção de Diels-Alder inversa. Essa mesma reacção será feita dentro da célula e devido aos vários componentes intracelulares presentes, tal como o facto da função quinazolinina estar relativamente perto do TCO, pode afectar a eficiência da reacção biortogonal entre a tetrazina e o TCO. Assim, foi decidido sintetizar também a quinazolinina **93**, com um espaçador (Figura 4.1), entre esta e o TCO, para que as probabilidades da função quinazolinina afectar a reacção de Diels-Alder inversa sejam diminuídas (**146**). O espaçador escolhido foi o aminoácido glicina – Esquema 4.8.



Esquema 4.8 - Metodologia e reacções químicas efectuadas na obtenção da quinazolina **146**. (i) Boc-Gly-OH, EDC·HCl, THF, t.a.; (ii) TFA, DCM, t.a.

Relativamente à 4-aminoquinazolina **93** derivada do *screening*, como já foi anunciado no capítulo 2.1.3, foi obtida com sucesso, através de uma hidrogenação catalítica do grupo funcional nitro, com 96 % de rendimento.

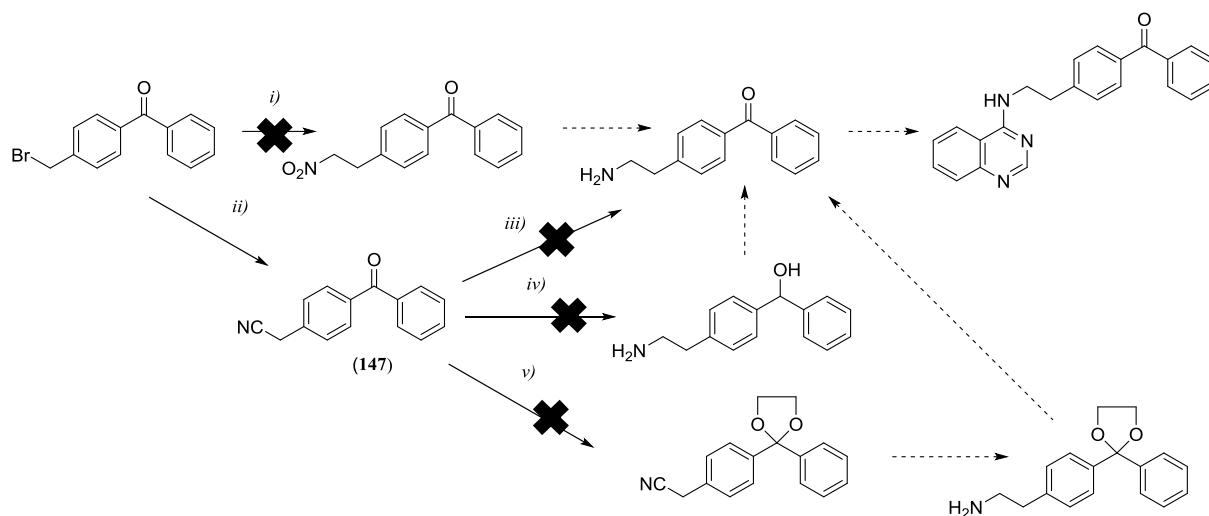
Quanto à síntese da 4-aminoquinazolina **145**, a metodologia usada teve como base um protocolo experimental descrito por Yamada *et al.*¹⁵⁴, segundo o qual se activou o ácido carboxílico da glicina protegida com o agente de acoplamento EDC·HCl, ficando esta, pronta para reagir com a amina livre da porção de quinazolina (passo *i*, Esquema 4.7). O composto **145** foi isolado com 40 % de rendimento, tendo sido a sua pureza confirmada pelos espectros monodimensionais de ¹H-RMN e ¹³C-RMN e bidimensionais COSY e HMQC. É de realçar, no espectro de ¹H-RMN a presença dos sinais característicos das 4-aminoquinazolinas finais, tal como um singuleto referente aos 9 prótons quimicamente equivalentes do grupo protector *tert*-butilcarbamato ($\delta = 1,47$ ppm), um duplete a $\delta = 3.98$ ppm, relativo aos prótons do CH₂ da glicina pelo acoplamento com o próton do grupo funcional carbamato (interacção confirmada pelo espectro de COSY) e um singuleto largo a campo baixo correspondente ao próton da amida formada entre o -NH₂ da função quinazolina e o ácido carboxílico da glicina. Este sinal situado a $\delta = 9.00$ ppm confirma a forte desblindagem do próton referido devido à presença de aromaticidade (função quinazolina) e um grupo electroatractor (grupo carbonilo). No espectro de ¹³C-RMN é possível confirmar a presença dos carbonos quaternários correspondentes aos carbonilos presentes, num desvio químico esperado, $\delta = 169.1$ e 162.7 ppm. O ponto de fusão foi determinado (98 – 100° C), tal como os espectros de RMN se encontram em anexo (capítulo 6).

Finalmente o composto **146** foi obtido pela desprotecção com TFA. Este tipo de desprotecção já foi enunciada anteriormente, ocorreu com 90 % de rendimento. O seu sucesso foi confirmado pela ausência do sinal dos 9 prótons equivalentes correspondentes ao Boc (capítulo 6.2.4.11.). Também foi realizado um espectro de infravermelho, que mostra a 1700 cm⁻¹ a banda correspondente à amida formada.

4.1.6. Síntese de sondas de foto-afinidade

A técnica de biomarcação por afinidade fotoquímica é outra técnica que pode fornecer informações importantes acerca do alvo molecular onde um composto bioactivo poderá estar a actuar.

Tal como foi referido na introdução, o uso de grupos fotoreactivos (GFR), dentro da célula, na presença de luz UV, forma intermediários bastante reactivos responsáveis por ligações covalentes ao alvo molecular desejado. Neste caso, a ideia formulada consistiu na incorporação de uma benzofenona (GFR) na função quinazolina (porção activa). A metodologia de síntese para a sonda fotoquímica está representada no Esquema 4.9.



Esquema 4.9 - Metodologia e reacções químicas efectuadas para tentar obter a sonda fotoquímica. (i) CH_3NO_2 , NaH 60%, solvente, t.a.; (ii) KCN, 1,4-Dioxano: H_2O (1:1), refluxo; (iii) H_2 , Pd/C – 10%, MeOH, 4,6 bar, t.a.; (iv) LiAlH_4 , THF, t.a.; (v) $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, refluxo, Dean-Stark;

Inicialmente, foi pensado, a partir da 4-(bromometil)benzofenona comercial substituir o átomo de bromo por um nucleófilo de nitrometano, aumentando assim a cadeia alquílica (neste tipo de compostos, cadeias alquílicas laterais com dois carbonos são mais activas ao nível biológico pretendido) – passo *i*, Esquema 4.9. Teoricamente, o nitrometano na presença de uma base forte (NaH) gera um carbanião estável por ressonância capaz de substituir o átomo de bromo no material de partida através de uma reacção de $\text{S}_{\text{N}}2$. No entanto, nas várias tentativas efectuadas, verificou-se que, ou o material de partida não reagiu, ou quando reagiu não formou o produto desejado (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 – Condições reaccionais das tentativas do passo i) do Esquema 4.9

Passo i)	Material de partida (mg, 1 equiv)	CH ₃ NO ₂ (mg, κ equiv)	NaH (mg, κ equiv)	Solvente (0,15 M)	Produto
Tentativa 1	100 mg	98 μ L, 5 equiv	70 mg, 5 equiv	THF seco	Não reagiu
Tentativa 2	100 mg	98 μ L, 5 equiv	70 mg, 5 equiv	DMF anidro	Não é o produto
Tentativa 3	100 mg	Usado como solvente (2,5 mL)	22 mg, 1,5 equiv	CH ₃ NO ₂	Não reagiu

Dado que a primeira metodologia não correu como o esperado, decidiu-se então escolher outra via sintética (Esquema 4.9) de modo a obter dois carbonos na cadeia alquílica. Assim, foi idealizado realizar uma reacção SN₂, onde se substitui o átomo de bromo por um bom nucleófilo, o cianeto (passo *ii*). A reacção foi seguida através de um protocolo descrito por Nakatani *et al.*¹⁵⁵ fazendo reagir a 4-(bromometil)benzofenona com KCN em 1,4-dioxano:H₂O (1:1) a refluxo. O produto do passo *ii* (**147**) foi isolado com 90 % de rendimento, sendo que a sua identificação estrutural por ¹H-RMN está de acordo com a literatura.¹⁵⁵

Como já foi referido, o objectivo de introduzir o grupo nitrilo no lugar do átomo de bromo era beneficiar da presença de dois átomos de carbono na cadeia alquílica após redução deste mesmo grupo nitrilo. A primeira tentativa de redução do grupo nitrilo foi efectuada através de uma hidrogenação catalítica com pressão (passo *iii*). Esta alternativa era atraente, pois, teoricamente, o grupo carbonilo não seria afectado. No entanto, verificou-se que após 24 h de reacção, o material de partida não foi consumido. Seguiu-se a tentativa de reduzir ambos os grupos funcionais da molécula (nitrilo e carbonilo) com LiAlH₄ (passo *iv*), para posteriormente, reoxidar selectivamente a função hidroxilo a carbonilo. No entanto, verificou-se que por ¹H-RMN não se obteve o produto pretendido, possivelmente devido a uma degradação do material de partida durante a reacção. Alternativamente, tentou proteger-se o grupo carbonilo com um diálcool de forma a poder selectivamente reduzir o grupo nitrilo com LiAlH₄ (passo *v*). A protecção do carbonilo foi tentada da forma tradicional, usando etileno glicol em tolueno a refluxo, usando um Dean-Stark,¹⁵⁶ mas o material de partida não foi consumido, indicando que não ocorreu protecção.

Mais uma vez, a escassez de tempo, não permitiu efectuar mais reacções noutras condições, no sentido de poder obter este tipo de sonda, pois ainda existem outras vias sintéticas que podem ser exploradas.

Capítulo 5

Conclusões e perspectivas futuras

5.1 Conclusões gerais e perspectivas futuras

Tendo em conta o resultado da escolha realizada (**93**, $IC_{50} = 12$ nM) após análise do *high-throughput screening* reportado por Derbyshire *et al.*⁷⁶, o principal objectivo deste trabalho foi sintetizar novos derivados de 4-aminoquinazolina como antimaláricos selectivos para a FH do parasita da infecção, explorando o ambiente químico à volta da molécula e, assim, desenvolver um estudo da relação de estrutura-actividade. Este tipo de derivados mostraram ser interessantes não só pelo elevado valor de IC_{50} para a FH que o *screening* revelou, mas também devido à baixa toxicidade em hepatócitos humanos e boa acessibilidade dos materiais de partida nos processos sintéticos dos novos compostos finais (**93** e **123 – 130**).

Como foi descrito no capítulo 2, foi possível efectuar a síntese, purificação e caracterização completa dos derivados de 4-aminoquinazolina finais. A estrutura dos compostos foi confirmada através das técnicas de 1H -RMN, ^{13}C -RMN, HMQC, HMBC, ESI-MS e análise elementar, permitindo identificar sinais característicos do sistema quinazolinico (protão em C2) e do éter de diarilo. A síntese dos compostos finais foi conseguida, na sua generalidade, em seis passos sintéticos, revelando ser eficiente e com bons rendimentos (56 – 98%).

Os novos derivados de 4-aminoquinazolina sintetizados demonstraram uma elevada actividade antiplasmódica e selectividade para a fase hepática da infecção (foram inactivos na fase sanguínea), com IC_{50} entre os 5 – 2064 nM. Com base nos ensaios realizados *in vitro*, a 4-aminoquinazolina **93** sintetizada em laboratório demonstra uma actividade semelhante à quinazolina **93** do *screening* ($IC_{50} = 8$ nM e $IC_{50} = 12$ nM, respectivamente), não apresentando citotoxicidade em células de linhagem humana Hek293T, ao contrário do composto **93**, que demonstrou ser ligeiramente citotóxico em células HepG2. Os estudos de SAR demonstraram que compostos substituídos com grupo electroatractores e electrodadores (-Br, -Cl, -OMe) nas posições 6 e 7 da função quinazolina mantém a elevada actividade antiplasmódica ($IC_{50} = 5 - 31$ nM) e não são citotóxicos. Por outro lado, a presença de grupos electroatractores pontencia a actividade em relação ao grupo electrodador ($IC_{50} = 5 - 13$ nM vs $IC_{50} = 20 - 31$ nM). O tamanho da cadeia alquílica lateral também foi estudado evidenciando que com a diminuição do tamanho da cadeia, a actividade diminui ($IC_{50} = 7$ nM (2 carbonos) *versus* $IC_{50} = 2064$ nM (0 carbonos)). Em geral, os novos derivados demonstraram ser bastante promissores quando comparados com a primaquina ($IC_{50} = 7500$ nM) sendo 227 – 1500 vezes mais activos. O composto **125** (-Br na posição 6) foi o mais activo do estudo com um $IC_{50} = 5$ nM.

Através dos valores de LogP é possível verificar que na presença de átomos electronegativos a lipofilía aumenta, diminuindo a solubilidade em água. Assim, este é um aspecto a melhorar futuramente, tal como estudar a estabilidade metabólica dos compostos em questão.

Estes derivados da 4-aminoquinazolina são compostos bastante promissores, devido à sua elevada actividade e selectividade para a FH, podendo fornecer uma terapia profilática à infecção por malária. É interessante realçar que, actualmente, existe uma grande variedade de quinazolinas com actividade contra a fase sanguínea (base de dados do *ChEMBL - Neglected Tropical Disease*) – Figura 5.1. Porém, os compostos sintetizados neste trabalho, apresentaram selectividade para a FH, o leva a desenvolver como perspectiva futura, tentar perceber a razão destes derivados serem selectivos para a FH.

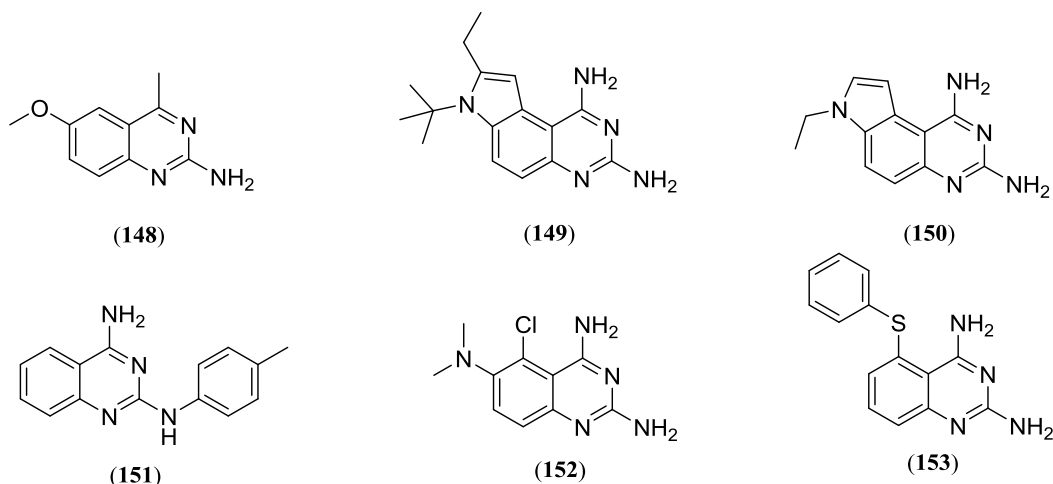


Figura 5.1 Alguns exemplos de quinazolinas activas contra a fase sanguínea presentes no arquivo do ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chemblntd>)

Contudo, não é ainda conhecido o mecanismo de acção, deste tipo de derivados sintetizados. Assim, o segundo objectivo foi sintetizar a sonda molecular baseada na fluorescência anteriormente falada. Apesar de não ter sido possível terminar a síntese de todos os intervenientes da sonda por escassez de tempo e também, devido ao facto de não se ter conseguido reproduzir alguns passos sintéticos já reportados na literatura, este tipo de ferramentas químicas são valiosas para estudar o modo de actuação dos compostos no organismo, podendo até, serem descobertos novos alvos moleculares terapêuticos.

Capítulo 6

Parte Experimental

6.1. Geral

Todas as manipulações de reagentes e/ou compostos químicos que requereram condições anidras foram realizadas em material de vidro seco em estufa, sob atmosfera inerte (azoto ou árgon). De modo a proceder à secagem dos produtos sintetizados recorreu-se a bombas de vácuo.

6.1.1. Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes utilizados foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, Alfa Aesar e Merck, sendo que os reagentes foram usados sem qualquer purificação adicional. A piridina (Merck) e a trietilamina (Sigma-Aldrich) foram destiladas com hidróxido de potássio e armazenadas em frascos escuros sob atmosfera inerte.

Na síntese dos compostos foram utilizados solventes de grau analítico (*p.a.*). Os solventes anidros adquiridos comercialmente (DMF e *i*-PrOH) para as reacções foram retirados do recipiente através de uma seringa, sob uma pressão positiva de azoto. Os restantes solventes foram secos à pressão atmosférica. O tetrahidrofurano (THF) da Panreac e o éter dietílico (Et₂O) foram previamente submetidos a refluxo, na presença de fio de sódio e benzofenona (Merck), usada como indicador de humidade. O tolueno foi seco com sódio e submetido a refluxo. O diclorometano (DCM), o metanol (MeOH) e o etanol (EtOH) foram destilados com cloreto de cálcio anidro.

Todos os solventes utilizados em purificações foram previamente destilados à pressão atmosférica.

A água usada em reacções, extracções e purificações foi destilada e purificada por permuta iónica utilizando um sistema MilliQ (Millipore Ltd.).

Os solventes deuterados utilizados para RMN (CDCl₃, MeOD e DMSO-*d*₆) eram da Sigma-Aldrich, com um grau de pureza superior a 99%.

6.1.2. Equipamento

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizados na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa num espectrómetro Bruker 400 MHz Ultra-Shield equipado com uma sonda nuclear de 5 mm (QNP, do inglês, *Quad Nuclear Probe*), operando a 400,13 MHz para protão (¹H) e 100,6 MHz para carbono (¹³C). Os dados são reportados da seguinte forma: desvio químico (δ), multiplicidade do sinal, apresentando-se como s (singuleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete), q (quarteto), m (multiplete) ou br (sinal largo, do inglês, *broad signal*), constante de acoplamento (*J* em Hz), integração e atribuição. Os desvios químicos são dados em partes por milhão (ppm) com o solvente como referência interna: CDCl₃ 7,26 ppm (¹H) / 77,20

ppm (^{13}C), DMSO- d_6 2,50 ppm (^1H) / 39,52 ppm (^{13}C) ou MeOD- d_4 3,31 ppm (^1H) / 49,00 ppm (^{13}C).

Os espectros de massa foram obtidos na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, com um espectrofotómetro de massa tandem (MS/MS) MicroMass QuattroMicro® API (Waters®, Ireland), do tipo triplo quadrupolo. As condições de ionização dos compostos foram optimizadas por infusão directa na fonte de ionização de electrospray em modo positivo (ESI^+). Para aquisição e processamento de dados utilizou-se o software MassLynx® versão 4.1. A temperatura da fonte foi mantida a 120 °C. Foi aplicado um potencial de capilar de 3 kV e um potencial de fonte de 30 V. Os espectros de massa foram obtidos em modo “*Full Scan*” para m/z 60-800. Quando necessário, fragmentou-se o ião molecular para determinação dos fragmentos característicos, sendo utilizado árgon como gás na câmara de colisão.

Na análise elementar, a determinação de C/H/N foi efectuada num "FLASH 2000 Series CHNS/O Analyzers" da Thermo Scientific equipado com um detector de condutividade térmica (TCD). Para aquisição e processamento de dados utilizou-se o *software* Eager Xperience. A amostra testada é pesada numa cápsula de estanho, pesando-se cerca de 2-3 mg de material orgânico.

Os espectros de infravermelho (IV) foram realizados num espectrofotómetro Nicolet Impact 400 FTIR. Os espectros foram obtidos sob a forma de filme em células de cloreto de sódio ou sob a forma de pastilhas com brometo de potássio como suporte.

Os pontos de fusão dos compostos sólidos foram medidos numa câmara Kofler Bock Monoscop M.

As reacções realizadas sob radiação micro-ondas foram feitas num aparelho CEM Discover fornecido pela QLabo. A potência do aparelho pode variar dos 0 – 800 W.

A reacção de isomerização do (*E*)-cicloocten-4-ol foi realizada num reactor de fotólise “tipo” *Rayonet* com lâmpadas de mercúrio Philips 254 nm TUV 8W G8 T5. O sistema montado em contínuo teve como auxiliar de pressão uma bomba de HPLC preparativo da BUCHI C-615.

6.1.3. Métodos

A técnica de cromatografia de camada fina (TLC) foi utilizada para monitorizar as reacções de síntese química e para identificar os produtos de reacção. As TLC foram realizadas em placas de sílica-gel 60 Merck Kieselgel F₂₅₄, de espessura 0,25 mm, e visualizadas usando uma lâmpada de UV (CAMAG), com um comprimento de onda de 254 ou 366 nm, ou reveladas com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (1:1), solução de KMnO_4 e solução de Ninidrina.

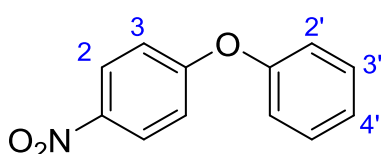
A técnica de cromatografia de camada fina preparativa (P-TLC) foi realizada em placas de vidro revestidas com sílica-gel (Merck Kieselgel, sílica-gel 60 GF₂₅₄ de espessura 0,75 mm) capazes de separar cerca de 10-50 mg, dependendo da eficiência da separação.

A cromatografia em coluna foi realizada para purificar, através da diferença de polaridade (FLASH), os compostos sintetizados. Todas as colunas de cromatografia foram preparadas com sílica gel 60 M de granulometria 0,040-0,063 mm (Merck).

6.2. Síntese

6.2.1. Aminas laterais

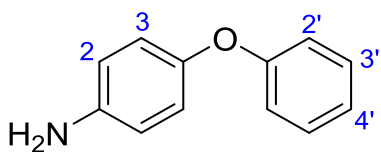
6.2.1.1. 1-Nitro-4-fenoxibenzeno (**105**)



A uma mistura de fenol (200 mg, 2,13 mmol, 1 equiv), 1-fluoro-4-nitrobenzeno (451 μ L, 4,25 mmol, 2 equiv), CuI (810 mg, 4,25 mmol, 2 equiv) e Na₂CO₃ anidro (450 mg, 4,25 mmol, 2 equiv) foram adicionados 3,5 mL de DMF anidro. A suspensão amarela foi agitada durante 2 h a refluxo, verificando-se a solubilização dos reagentes à medida que a temperatura aumentou. Após essa solubilização a mistura mudou de cor para acastanhado. Terminada a reacção foi adicionada água (15 mL) e foram realizadas extracções com DCM (4 x 20 mL). A fase orgânica foi lavada com brine, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada. Os 617 mg de crude obtidos foram purificados por cromatografia flash (*n*-hexano/éter dietílico, 9:1), originando um óleo amarelo (396 mg, 87%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.20 (d, 2H, *J* = 9.2 Hz, Ar-*H*2), 7.44 (t, 2H, *J* = 8.4 Hz, Ar-*H*3'), 7.26 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, Ar-*H*4), 7.09 (d, 2H, *J* = 7.6 Hz, Ar-*H*2'), 7.01 (d, 2H, *J* = 9.2 Hz, Ar-*H*3). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁵⁷

6.2.1.2. 4-Fenoxianilina (**106**)¹³²



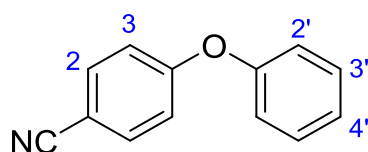
A uma solução de **105** (375 mg, 1,74 mmol, 1 equiv) em 5,2 mL de MeOH seco. De seguida, foram adicionados 56 mg de Pd-C 10% (15% da massa de **105**) e posteriormente TES (1,4 mL, 8,72 mmol, 5 equiv), gota-a-gota, sob atmosfera inerte. A solução foi agitada à t.a. durante 1 h. Terminada a reacção, o catalisador foi removido através de uma filtração num funil de placa porosa com um pequena porção de celite. O solvente foi evaporado obtendo-se

611 mg de crude que foi purificado por cromatografia flash (*n*-hexano/éter dietílico, 9:1), originando um sólido cor-de-rosa claro (240 mg, 75%).

Ponto de fusão: 82 - 85° C [lit. 83-84° C]¹⁵⁸

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.28 (t, 2H, *J* = 8.4 Hz, Ar-*H*3'), 7.01 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, Ar-*H*4'), 6.93 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Ar-*H*2'), 6.88 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Ar-*H*3), 6.68 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Ar-*H*2), 3.58 (s, 2H, NH₂). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁵⁸

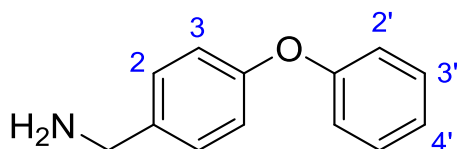
6.2.1.3 4-Fenoxibenzonitrilo (**107**)¹³¹



A uma mistura de 4-fluorobenzonitrilo comercial (250 mg, 2,06 mmol, 1 equiv), fenol (214 mg, 2,27 mmol, 1,1 equiv) e Na₂CO₃ anidro (241 mg, 2,27 mmol, 1,1 equiv) foram adicionados 5 mL de DMF anidro. A suspensão foi agitada sob atmosfera inerte durante 21 h a refluxo, verificando-se a solubilização dos reagentes à medida que a temperatura aumentou. Terminada a reacção foi adicionada água (35 mL) e foram realizadas extracções com DCM (5 x 20 mL), primeiro a pH alcalino e, depois a pH neutro. A fase orgânica foi lavada com brine, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada. Os 531 mg de crude obtidos foram purificados por cromatografia flash (*n*-hexano/éter dietílico, 9:1), originando um óleo amarelo claro (349 mg, 87%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.60 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Ar-*H*2), 7.42 (t, 2H, *J* = 8.4 Hz, Ar-*H*3'), 7.23 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, Ar-*H*4'), 7.07 (d, 2H, *J* = 7.6 Hz, Ar-*H*2'), 7.00 (d, 2H, *J* = 9.2 Hz, Ar-*H*3). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁵⁹

6.2.1.4. 1-(4-Fenoxifenil)etanamina (**108**)



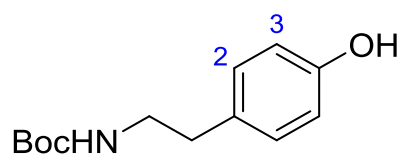
A uma solução de **107** (100 mg, 0,51 mmol, 1 equiv) em 2,5 mL de THF seco foram adicionadas, lentamente, pequenas porções de LiAlH₄ (58 mg, 1,54 mmol, 3 equiv) a 0° C verificando-se a libertação de gases de hidrogénio. A mistura foi agitada cerca de 1h sob atmosfera inerte a 0° C. Ao fim desse tempo deixou-se atingir a t.a. agitando durante 6 h. Terminada a reacção, adicionou-se a 0° C KHSO₄ 10%, gota-a-gota, e, de seguida, extraiu-se a fase aquosa com AcOEt (2 x 15 mL). O meio aquoso foi então basificado com NaOH 1M até pH ~ 8, seguindo-se mais duas extracções com AcOEt (15 mL) de modo a garantir a completa extracção do produto da fase aquosa. A junção das fases orgânicas foi lavada com brine,

seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado. Os 96 mg de crude obtidos foram purificados por cromatografia flash (CHCl₃/MeOH, 9:1), originando um sólido amarelo (72 mg, 71%).

Ponto de fusão: 185 - 188° C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36 – 7.26 (m, 4H, Ar-*H*2 e *H*3'), 7.09 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, Ar-*H*4'), 7.02 – 6.96 (m, 4H, Ar-*H*3 e *H*2'), 3.86 (s, 2H, CH₂). O espectro está de acordo com a literatura.¹³³

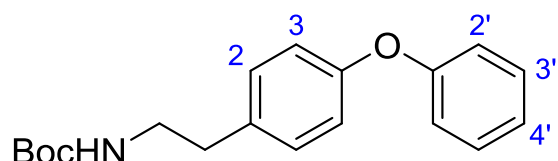
6.2.1.5. *tert*-Butil-(4-hidroxifenetil)carbamato (109)



A Tiramina na forma de hidrocloreto (500 mg, 2,88 mmol, 1 equiv) foi dissolvida em 14 mL de 1,4-dioxano/H₂O (1:1) seguindo-se a adição de comercial Boc₂O (755mg, 3,46 mmol, 1,2 equiv) e TEA (1,2 mL, 8,64 mmol, 3 equiv). A mistura foi agitada à t.a. durante 24 h. Terminada a reacção, a fase aquosa foi lavada com éter de petróleo (2 x 20 mL) e AcOEt (20 mL) e após juntar as fases orgânicas foi realizada uma lavagem com brine. De seguida, a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e o crude obtido seco sob vácuo. Os 700 mg de crude obtidos foram purificados por cromatografia flash (*n*-hexano/AcOEt, 8:2) originando um óleo amarelo claro (611 mg, 89%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.03 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, Ar-*H*2), 6.77 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, Ar-*H*3), 5.52 (br s, 1H, OH), 4.57 (br s, 1H, NH), 3.36 - 3.28 (m, 2H, CH₂NH), 2.71 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂CH₂NH), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁶⁰

6.2.1.6. *tert*-Butil-(4-fenoxifenetil)carbamato ¹³⁴

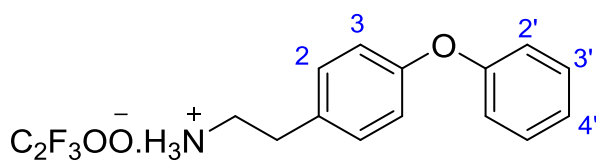


A uma mistura de **109** (488 mg, 2,1 mmol, 1 equiv), Cu(OAc)₂ (374 mg, 2,1 mmol, 1 equiv), ácido fenil borónico (377 mg, 3,1 mmol, 1,5 equiv) e 100 mg de crivos moleculares 3Å em DCM 0,2 M seco foi adicionada piridina seca (839 µL, 10,3 mmol, 5 equiv). A reacção foi agitada durante 24 h à t.a.. A mistura reaccional foi então filtrada sob vácuo com um pedaço de sílica num funil de placa porosa para remover o cobre, sendo a sílica lavada várias vezes com DCM. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e o crude obtido seco sob vácuo. Os 970 mg de crude obtidos foram purificados por cromatografia flash (*n*-hexano/AcOEt, 9:1) originando cristais brancos (577 mg, 87%).

Ponto de fusão: 58 - 60° C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.33 (t, 2H, J = 8.0 Hz, Ar-*H*3'), 7.15 (d, 2H, J = 8.3 Hz, Ar-*H*2), 7.09 (t, 1H, J = 7.4 Hz, Ar-*H*4'), 7.00 (d, 2H, J = 7.6, Ar-*H*2'), 6.95 (d, 2H, J = 8.5 Hz, Ar-*H*3), 4.56 (br s, 1H, NH), 3.37 (q, 2H, J = 6.0 Hz, CH₂NH), 2.77 (t, 2H, J = 6.8 Hz, CH₂CH₂NH), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁶¹

6.2.1.7. 2-(4-Fenoxifenil)etan-1-aminio-2, 2, 2-trifluoroacetato (110)



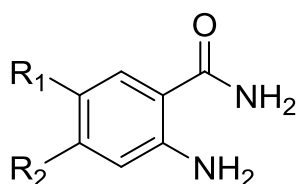
O *terc*-butil-(4-fenoxifenetil)carbamato (529 mg, 1,69 mmol, 1 equiv) foi desprotegido com TFA (13 mL, 169 mmol, 100 equiv) em igual volume de DCM (13 mL) 0,13 M, tendo sido a reacção

agitada durante 3 h à t.a.. Terminada a reacção, o solvente foi evaporado e foram realizadas sucessivas co-evaporações com MeOH (4x) e depois com Et₂O (3x) até obter o correspondente sal de TFA sob a forma de sólido branco (550 mg, 100%).

Ponto de fusão: 100 - 102° C

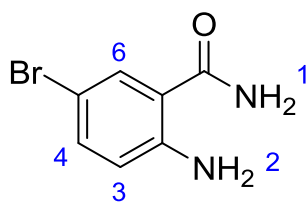
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.90 (br s, 3H, ⁺NH₃), 7.38 (t, 2H, J = 7.6 Hz, Ar-*H*3'), 7.27 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ar-*H*2), 7.13 (t, 1H, J = 7.4 Hz, Ar-*H*4'), 6.98 (d, 4H, J = 5.2 Hz, Ar-*H*2' e *H*3), 3.04 (t, 2H, J = 7.6 Hz, ⁺NH₃CH₂CH₂), 2.84 (t, 2H, J = 7.8 Hz, ⁺NH₃CH₂CH₂).

6.2.2. 2-Aminobenzamidas (111 - 116) ⁹⁸



PROCEDIMENTO GERAL A: A uma solução de ácido antranílico correspondente (1 equiv) e HOBt· x H₂O (1,1 equiv) em DMF 0,2 M sob agitação e atmosfera inerte, foi adicionado EDC·HCl (1,1 equiv). A mistura agitou à t.a. durante 2 h, seguindo-se a adição de NH₃ 25%, a 0° C. A reacção foi agitada mais 1 h à t.a. e, terminada a reacção adicionou-se NaHCO₃ 5% (10 mL), sendo a fase aquosa extraída com AcOEt (3 x 20 mL). A junção das fases orgânicas foi lavada com brine (20 mL), seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida.

6.2.2.1. 2-Amino-5-bromobenzamida (111)

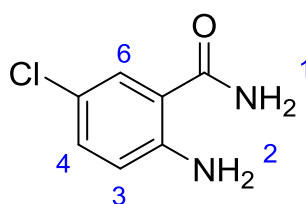


Reacção entre o ácido 2-amino-5-bromobenzóico (500 mg, 2,32 mmol, 1 equiv), o HOBT· κ H₂O (394 mg, 2,55 mmol, 1,1 equiv), o EDC·HCl (471 mg, 2,55 mmol, 1,1 equiv) e a amónia 25% (220 μ L) de acordo com o procedimento geral A. Obtidos 523 mg de sólido amarelo (crude) que foram purificados através de cromatografia flash (AcOEt/*n*-hexano, 3:2) dando 407 mg (82 %) de 2-amino-5-bromobenzamida **111** sob a forma de sólido amarelo claro.

Ponto de fusão: 173 - 175° C [lit. 176-177° C]¹⁶²

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.83 (br s, 1H, CONH₂), 7.69 (d, 1H, *J* = 1.2 Hz, Ar-*H*6), 7.25 (dd, 1H, *J* = 8.8, 1.2 Hz, Ar-*H*4), 7.16 (br s, 1H, CONH₂), 6.70 (s, 2H, Ar-NH₂), 6.65 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar-*H*3). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁶³

6.2.2.2. 2-Amino-5-clorobenzamida (112)

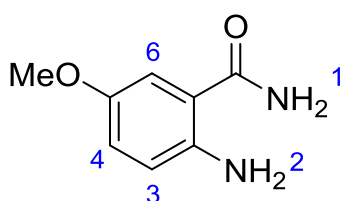


Reacção entre o ácido 2-amino-5-clorobenzóico (500 mg, 2,92 mmol, 1 equiv), o HOBT· κ H₂O (491 mg, 3,21 mmol, 1,1 equiv), o EDC·HCl (615 mg, 3,21 mmol, 1,1 equiv) e a amónia 25% (260 μ L) de acordo com o procedimento geral A. Obtidos 658 mg de sólido amarelo (crude) que foram purificados através de cromatografia flash (AcOEt/*n*-hexano, 2:3) dando 351 mg (71 %) de 2-amino-5-clorobenzamida **112** sob a forma de sólido amarelo claro.

Ponto de fusão: 172 - 175° C [lit. 174° C]¹⁶³

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.83 (br s, 1H, CONH₂), 7.59 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, Ar-*H*6), 7.19 - 7.12 (m, 2H, CONH₂ e Ar-*H*4), 6.71 (br s, 2H, Ar-NH₂), 6.69 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz, Ar-*H*3). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁶³

6.2.2.3. 2-Amino-5-metoxibenzamida (113)

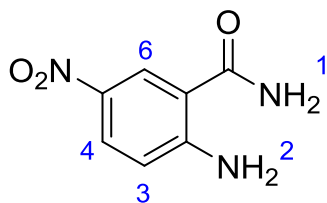


Reacção entre o ácido 2-amino-5-metoxibenzóico (500 mg, 3 mmol, 1 equiv), o HOBT· κ H₂O (505 mg, 3,3 mmol, 1,1 equiv), o EDC·HCl (630 mg, 3,3 mmol, 1,1 equiv) e a amónia 25% (267 μ L) de acordo com o procedimento geral A. Obtidos 660 mg de sólido amarelo (crude) que foram purificados através de cromatografia flash (AcOEt/*n*-hexano, 7:3) dando 128 mg (26 %) de 2-amino-5-metoxibenzamida **113** sob a forma de sólido amarelo pálido.

Ponto de fusão: 109 - 111° C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.72 (br s, 1H, CONH₂), 7.09 - 7.01 (m, 2H, CONH₂ e Ar-*H*₆), 6.79 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.8 Hz, Ar-*H*₄), 6.59 (d, 1H *J* = 8.8 Hz, Ar-*H*₃), 6.07 (br s, 2H, Ar-NH₂), 3.63 (s, 3H, Ar-OCH₃). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁶⁴

6.2.2.4. 2-Amino-5-nitrobenzamida (**114**)

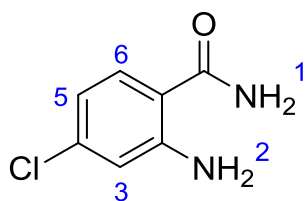


Reacção entre o ácido 2-amino-5-nitrobenzóico (250 mg, 1,37 mmol, 1 equiv), o HOBT·*x*H₂O (233 mg, 1,5 mmol, 1,1 equiv), o EDC·HCl (278 mg, 1,5 mmol, 1,1 equiv) e a amónia 25% (130 μ L) de acordo com o procedimento geral A. Obtidos 412 mg de sólido amarelo-torrado (crude) que foram purificados através de cromatografia flash (AcOEt/MeOH, 9,5:0,5) originando 248 mg (99 %) de 2-amino-5-nitrobenzamida **114** sob a forma de sólido amarelo.

Ponto de fusão: 238 - 240° C [lit. 225-230° C]¹⁶⁵

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.55 (s, 1H, Ar-*H*₆), 8.22 (br s, 1H, CONH₂), 8.01 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, Ar-*H*₄), 7.90 (br s, 2H, Ar-NH₂), 7.42 (br s, 1H, CONH₂), 6.79 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, Ar-*H*₃). O espectro está de acordo com a literatura.¹³⁰

6.2.2.5. 2-Amino-4-clorobenzamida (**115**)

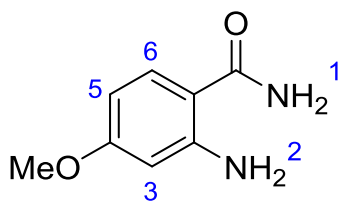


Reacção entre o ácido 2-amino-4-clorobenzóico (250 mg, 1,5 mmol, 1 equiv), o HOBT·*x*H₂O (268 mg, 1,8 mmol, 1,2 equiv), o EDC·HCl (308 mg, 1,6 mmol, 1,1 equiv) e a amónia 25% (130 μ L) de acordo com o procedimento geral A. Obtidos 549 mg de óleo castanho-escuro (crude) que foram purificados através de cromatografia flash (AcOEt/*n*-hexano, 1:1) originando 133 mg (54 %) de 2-amino-4-clorobenzamida **115** sob a forma de sólido branco.

Ponto de fusão: 188 - 190° C [lit. 180-182° C]¹⁶⁶

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.79 (br s, 1H, CONH₂), 7.53 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar-*H*₆), 7.17 (br s, 1H, CONH₂), 6.83 (s, 2H, Ar-NH₂), 6.73 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, Ar-*H*₃), 6.48 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.0 Hz, Ar-*H*₅). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁶⁷

6.2.2.6. 2-Amino-4-metoxibenzamida (**116**)

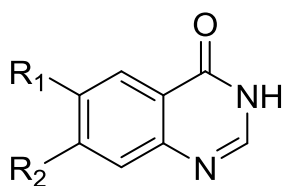


Reacção entre o ácido 2-amino-4-metoxibenzóico (250 mg, 1,5 mmol, 1 equiv), o HOBT·xH₂O (276 mg, 1,8 mmol, 1,2 equiv), o EDC·HCl (316 mg, 1,7 mmol, 1,1 equiv) e a amónia 25% (134 µL) de acordo com o procedimento geral A. Obtidos 392 mg de óleo amarelo (crude) que foram purificados através de cromatografia flash (AcOEt/*n*-hexano, 7:3) originando 86 mg (35 %) de 2-amino-4-metoxibenzamida **116** sob a forma de sólido branco.

Ponto de fusão: 155 - 157° C [lit. 163° C]¹⁶⁸

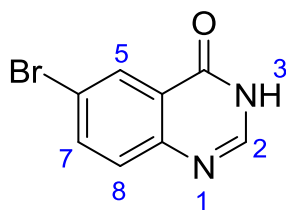
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.48 (d, 1H, *J* = 12.0 Hz, Ar-*H*₆), 6.73 (br s, 2H, Ar-NH₂), 6.18 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz, Ar-*H*₃), 6.05 (dd, 1H, *J* = 12.0, 3.2 Hz, Ar-*H*₅), 3.68 (s, 3H, Ar-OCH₃). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁶⁷

6.2.3. Quinazolin-4(3H)-onas ⁹⁸



PROCEDIMENTO GERAL B: A uma mistura da 2-aminobenzamida correspondente (**111** – **116**) e trimetilortoformato (0,013 equiv) foi adicionado HCl 37%. A foi agitada durante 1,5 h - 3 h dependendo do material de partida, à t.a. e sob atmosfera inerte. Terminada a reacção, foi adicionada H₂O (5 mL), o pH foi ajustado até 7-8 com NaOH 5N, extraíndo-se a fase aquosa com AcOEt (4 x 10 mL). A fase orgânica obtida foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida. O produto obtido foi utilizado nas reacções subsequentes sem purificação adicional.

6.2.3.1. 6-Bromoquinazolin-4(3H)-ona (117)



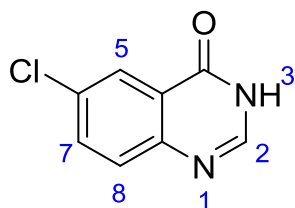
A uma solução de 2-amino-5-bromobenzamida **111** (370 mg, 1,72 mmol, 1 equiv) e trimetilortoformato (2,5 mL, 0,022 mmol, 0,013 equiv) foram adicionados 215 μ L de HCl 37%. A mistura foi agitada durante 3 h e, de seguida, todo o processo decorreu de acordo com procedimento geral B.

Foram obtidos 295 mg de sólido bege (77%).

Ponto de fusão: 284 - 286° C [lit. 267° C]¹⁶⁹

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.43 (br s, 1H, NH), 8.20 (s, 1H, Ar-*H*2), 8.13 (s, 1H, Ar-*H*5), 7.96 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar-*H*7), 7.62 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar-*H*8). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁶⁹

6.2.3.2. 6-Cloroquinazolin-4(3H)-ona (118)



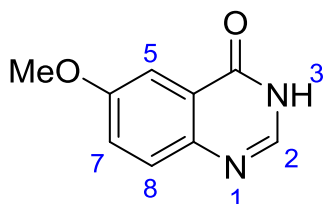
A uma solução de 2-amino-5-clorobenzamida **112** (273 mg, 1,62 mmol, 1 equiv) e trimetilortoformato (2,3 mL, 0,021 mmol, 0,013 equiv) foram adicionados 200 μ L de HCl 37%. A foi agitada durante 3 h e, de seguida, todo o processo decorreu de acordo com procedimento geral B. Foram

obtidos 233 mg de sólido amarelo claro (80%).

Ponto de fusão: 273 - 275° C [lit. 265° C]¹⁶⁹

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.43 (br s, 1H, NH), 8.13 (s, 1H, Ar-*H*2), 8.06 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, Ar-*H*5), 7.85 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.0 Hz, Ar-*H*7), 7.70 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar-*H*8). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁶⁹

6.2.3.3. 6-Metoxiquinazolin-4(3H)-ona (119)



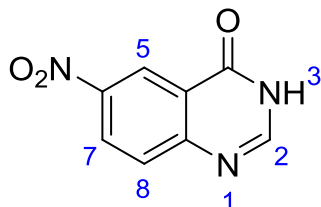
A uma solução de 2-amino-5-metoxibenzamida **113** (128 mg, 0,77 mmol, 1 equiv) e trimetilortoformato (1,5 mL, 0,01 mmol, 0,013 equiv) foram adicionados 100 μ L de HCl 37%. A mistura foi agitada durante 2,5 h e, de seguida, todo o processo decorreu de acordo com

procedimento geral B. Foram obtidos 123 mg de sólido amarelo pálido (91%).

Ponto de fusão: 240 - 243° C [lit. 238-240° C]¹⁷⁰

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.15 (br s, 1H, NH), 7.96 (s, 1H, Ar-*H*2), 7.60 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar-*H*5), 7.49 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz, Ar-*H*8), 7.40 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.8 Hz, Ar-*H*7), 3.85 (s, 3H, Ar-OCH₃).

6.2.3.4. 6-Nitroquinazolin-4(3*H*)-ona (120)

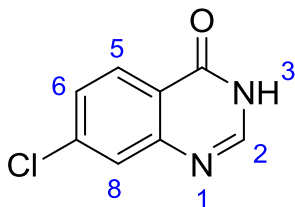


A uma solução de 2-amino-5-nitrobenzamida **114** (150 mg, 0,82 mmol, 1 equiv) e trimetilortoformato (1,6 mL, 0,01 mmol, 0,013 equiv) foram adicionados 107 μ L de HCl 37%. A mistura foi agitada durante 3 h e, de seguida, todo o processo decorreu de acordo com procedimento geral B. Foram obtidos 145 mg de sólido amarelo (93%).

Ponto de fusão: 188 - 191° C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.78 (br s, 1H, NH), 8.80 (s, 1H, Ar-*H*5), 8.55 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, Ar-*H*7), 8.32 (s, 1H, Ar-*H*2), 7.87 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, Ar-*H*8). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁷¹

6.2.3.5. 7-Cloroquinazolin-4(3*H*)-ona (121)

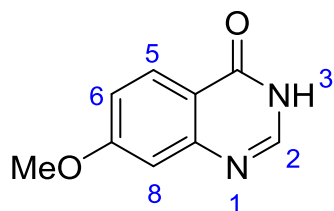


A uma solução de 2-amino-4-clorobenzamida **115** (125,5 mg, 0,74 mmol, 1 equiv) e trimetilortoformato (1,1 mL, 0,01 mmol, 0,013 equiv) foram adicionados 91 μ L de HCl 37%. A mistura foi agitada durante 3 h e, de seguida, todo o processo decorreu de acordo com procedimento geral B. Foram obtidos 130,8 mg de sólido branco (99%).

Ponto de fusão: 225 - 227° C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.42 (br s, 1H, NH), 8.14 (s, 1H, Ar-*H*2), 8.11 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar-*H*5), 7.73 (s, 1H, Ar-*H*8), 7.56 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.2 Hz, Ar-*H*6). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁷²

6.2.3.6. 7-Metoxiquinazolin-4(3H)-ona (122)



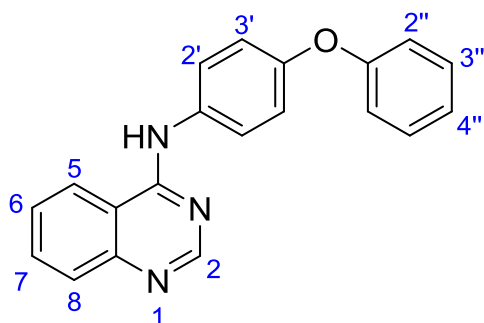
A uma solução de 2-amino-4-metoxibenzamida **116** (84 mg, 0,51 mmol, 1 equiv) e trimetilortoformato (1 mL, 0,007 mmol, 0,013 equiv) foram adicionados 65 μ L de HCl 37%. A mistura foi agitada durante 3 h e, de seguida, todo o processo decorreu de acordo com procedimento geral B. Foram obtidos 83,4 mg de sólido branco (94%).

Ponto de fusão: 268 - 270° C

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.11 (br s, 1H, NH), 8.06 (s, 1H, Ar- H_2), 8.01 (d, 1H, J = 9.6 Hz, Ar- H_5), 7.12 – 7.06 (m, 2H, Ar- H_8 e H_6), 3.89 (s, 3H, Ar- OCH_3). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁷³

6.2.4. 4-Aminoquinazolininas finais

6.2.4.1. *N*-(4-fenoxifenil)quinazolin-4-amina (123)



A uma mistura de 4-cloroquinazolina (75 mg, 0,46 mmol, 1 equiv), 4-fenoxianilina **106** (89 mg, 0,48 mmol, 1,05 equiv) e Et_3N (70 μ L, 0,51 mmol, 1,1 equiv) foi adicionado *i*-PrOH (2,3 mL, 0,2 M). A reacção foi irradiada com micro-ondas (80 W) a 80° C durante 40 minutos. Terminada a reacção foi adicionado ácido cítrico 5% (15 mL) e a fase aquosa foi extraída com DCM (3 x 20 mL). A junção das fases orgânicas foi lavada com brine, seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e o solvente evaporado. Os 136 mg de crude obtidos foram purificados por cromatografia flash (AcOEt/ *n*-hexano, 3:2) originando um sólido bege (114 mg, 80 %).

Ponto de fusão: 172 - 175° C

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.82 (s, 1H, NH), 8.57 (s, 1H, Ar- H_2), 8.54 (d, 1H, J = 7.9 Hz, Ar- H_8), 7.89 – 7.82 (m, 3H, Ar- H_2' e H_6), 7.78 (d, 1H, J = 7.4 Hz, Ar- H_5), 7.64 (t, 1H, J = 7.6 Hz, Ar- H_7), 7.40 (t, 2H, J = 8.8 Hz, Ar- H_3''), 7.13 (t, 1H, J = 7.4 Hz, Ar- H_4''), 7.08 (d, J = 8.8 Hz, 2H, Ar- H_3'), 7.02 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar- H_2'').

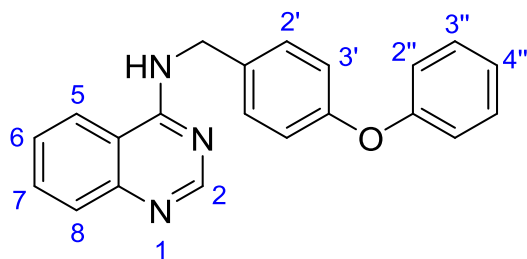
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 157.7 (C_{arom}), 157.3 (C_{arom}), 154.5 (CH_{arom}), 152.4 (C_{arom}), 149.6 (C_{arom}), 134.8 (C_{arom}), 133.0 (CH_{arom}), 130.0 (CH_{arom}), 127.8 (CH_{arom}), 126.2 (CH_{arom}), 124.3 (CH_{arom}), 123.1 (CH_{arom}), 122.9 (CH_{arom}), 119,1 (CH_{arom}), 118,1 (CH_{arom}) 115.1 (C_{arom}).

IV (KBr): ν_{\max} = 3055, 3041, 2920, 1487, 1527, 1571, 1417, 1224, 1236 cm^{-1}

ESI-MS m/z (abund): 314,24 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100%)

Análise Elementar (%): Calculada ($\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$), C 76,66; H 4,83; N 13,41. Experimental, C 76,68; H 4,94; N 13,34.

6.2.4.2. *N*-(4-Fenoxibenzil)quinazolin-4-amina (124)



A uma mistura de 4-cloroquinazolina (50 mg, 0,31 mmol, 1 equiv), 1-(4-fenoxifenil)metanamina **108** (69 mg, 0,32 mmol, 1,05 equiv) e TEA (47 μL , 0,33 mmol, 1,1 equiv) foi adicionado *i*-PrOH anidro (1,53 mL, 0,2 M). A reação foi irradiada com micro-ondas (80 W) a 80° C durante 40 minutos. Terminada a reação foi adicionado ácido cítrico 5% (15 mL) e a fase aquosa foi extraída com DCM (3 x 20 mL). De seguida a fase aquosa foi neutralizada com NaOH 1N e foi novamente extraída com DCM (2 x 20 mL). A junção das fases orgânicas foi lavada com brine, seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. Os 90 mg de crude obtidos foram purificados por cromatografia flash (AcOEt/*n*-hexano, 3:2) originando um sólido branco (55 mg, 56 %).

Ponto de fusão: 171 - 173° C

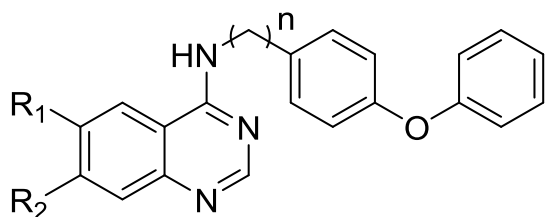
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.80 (t, 1H, J = 5.8 Hz, NH), 8.41 (s, 1H, Ar- H_2), 8.25 (d, 1H, J = 8.4, Ar- H_8), 7.73 (t, 1H, J = 7.4 Hz, Ar- H_6), 7.65 (d, 1H, J = 8.4 Hz, Ar- H_5), 7.48 (t, 1H, J = 7.6 Hz, Ar- H_7), 7.33 (m, 4H, Ar- H_2' e H_3''), 7.06 (t, 1H, J = 7.4 Hz, Ar- H_4''), 6.92 (d, 4H, J = 8.4 Hz, Ar- H_3' e H_2''), 4.73 (d, 2H, J = 6.0 Hz, NHCH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 159.4 (C_{arom}), 156.9 (C_{arom}), 155.4 (C_{arom}), 155.1 (CH_{arom}), 149.2 (C_{arom}), 134.7 (C_{arom}), 132.7 (CH_{arom}), 130.1 (CH_{arom}), 129.1 (CH_{arom}), 127.6 (CH_{arom}), 125.8 (CH_{arom}), 123.3 (CH_{arom}), 122.7 (CH_{arom}), 118.8 (CH_{arom}), 118.4 (CH_{arom}), 115.0 (C_{arom}), 43.0 (CH_2).

IV (KBr): ν_{\max} = 3229, 3119, 3067, 2919, 1506, 1499, 1492, 1322, 1288, 1276 cm^{-1}

ESI-MS m/z (abund): 328,12 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100%)

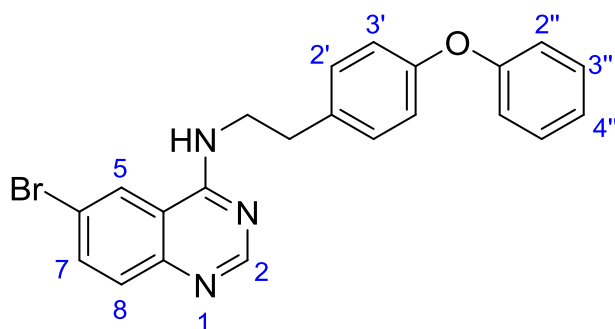
Análise Elementar (%): Calculada ($\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$), C 77,04; H 5,23; N 12,84. Experimental, C 76,81; H 5,33; N 12,46



PROCEDIMENTO GERAL C PARA O ACOPLAMENTO DAS QUINAZOLINAS FINAIS (SUBSTITUIDAS EM -6 E -7): ^{138, 94}

A uma suspensão da quinazolin-4(3*H*)-ona correspondente (1 equiv) e DIPEA (1,5 equiv) em tolueno 0,33 M foi agitada durante 1 h a refluxo. Em cima do condensador colocou-se um tubo de secagem com CaCl₂. A esta solução activada adicionou-se POCl₃ (1,55 equiv), sendo esta mistura agitada durante 3 h a 80° C. Terminada a reacção, foi diluída com AcOEt e lavada com água fria (5 mL), NaHCO₃ aq. saturado (5 mL), água (5 mL), ácido cítrico 5% (5 mL), água (5 mL), NaHCO₃ aq. saturado (5 mL) e brine (5 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado obtendo o composto clorado que foi usado directamente no acoplamento final, onde a uma solução do composto clorado e amina (1,2 equiv) em DCM:*i*-PrOH (2:1) anidro (concentração final de compostos clorados 0,1 M) foi adicionada Et₃N (2,4 equiv), sendo a mistura reaccional agitada a 50° C, sob atmosfera inerte, durante a noite. Terminada a reacção, foi adicionado ácido cítrico 5% (10 mL), extraindo-se a fase aquosa com DCM (3 x 10 mL) a pH~8 (acertado com NaOH 1N). A fase orgânica obtida foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida.

6.2.4.3. 6-Bromo-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (125)



À suspensão de quinazolona **117** (68 mg, 0,3 mmol, 1 equiv) com DIPEA (91 µL, 0,45 mmol, 1,5 equiv) em tolueno (911 µL) adicionou-se POCl₃ (43 µL, 0,47 mmol, 1,55 equiv) que a fez solubilizar numa solução amarela clara. A reacção e lavagem posterior decorreram de acordo com o procedimento geral C para dar o

crude do 6-bromo-4-quinazolina (sólido amarelo) que foi usado directamente no acoplamento final com o sal de TFA **110** (118 mg, 0,36 mmol, 1,2 equiv). A solubilização foi feita com 3 mL de DCM:*i*-PrOH (2:1), adicionando no fim, Et₃N (101 µL, 0,72 mmol, 2,4 equiv). A reacção e lavagem posterior decorreram de igual forma ao procedimento geral C. Os 130 mg de crude

alaranjado obtidos foram purificados por cromatografia flash (AcOEt/*n*-hexano, 3:2), originando um sólido branco (108 mg, 86 %).

Ponto de fusão: 147 - 149° C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.50 (s, 1H, Ar-*H*₂), 8.49 - 8.44 (m, 2H, Ar-*H*₅ e NH), 7.86 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar-*H*₇), 7.60 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar-*H*₈), 7.34 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, Ar-*H*_{3''}), 7.25 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, Ar-*H*_{3'}), 7.08 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, Ar-*H*_{4''}), 6.95 - 6.89 (m, 4H, Ar-*H*_{2'} e Ar-*H*_{2''}), 3.72 (q, 2H, *J* = 6.8 Hz, NHCH₂CH₂), 2.92 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, NHCH₂CH₂).

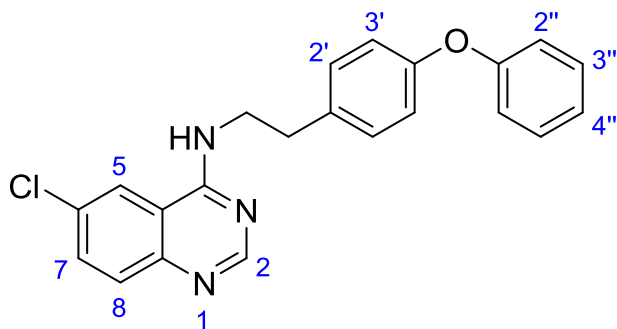
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.9 (C_{arom}), 157.5 (C_{arom}), 156.0 (CH_{arom}), 155.3 (C_{arom}), 148.4 (C_{arom}), 136.0 (CH_{arom}), 135.1 (C_{arom}), 130.7 (CH_{arom}), 130.4 (CH_{arom}), 130.3 (CH_{arom}), 125.6 (CH_{arom}), 123.6 (CH_{arom}), 119.3 (CH_{arom}), 118.7 (CH_{arom}), 118.3 (C_{arom}), 116.7 (C_{arom}), 42.65 (NHCH₂CH₂), 34.08 (NHCH₂CH₂).

IV (KBr): ν_{\max} = 3251, 3101, 3021, 2930, 1554, 1380, 1375, 1287, 1275, 560 cm⁻¹

ESI-MS *m/z* (abund): 420,06 [M + H]⁺ (92 %), 422,06 [M + H]⁺ (100 %)

Análise Elementar (%): Calculada (C₂₂H₁₈BrN₃O•0,2H₂O), C 62,51; H 4,40; N 9,94. Experimental (C₂₂H₁₈BrN₃O), C 62,90; H 4,54; N 9,55.

6.2.4.4. 6-Cloro-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (126)



À suspensão de quinazolona **118** (50 mg, 0,28 mmol, 1 equiv) com DIPEA (76 µL, 0,42 mmol, 1,5 equiv) em tolueno (840 µL) adicionou-se POCl₃ (40 µL, 0,43 mmol, 1,55 equiv) que a fez solubilizar numa solução amarela clara. A reacção e lavagem posterior decorreram de acordo com o procedimento geral C para dar o

crude do 6-cloro-4-quinazolina (agulhas amarelas) que foi usado directamente no acoplamento final com o sal de TFA **110** (109 mg, 0,33 mmol, 1,2 equiv). A solubilização foi feita com 2,7 mL de DCM:*i*-PrOH (2:1), adicionando no fim, Et₃N (93 µL, 0,67 mmol, 2,4 equiv). A reacção e lavagem posterior decorreram de igual forma ao procedimento geral C. Os 102 mg de crude acastanhado obtidos foram purificados por cromatografia flash (AcOEt/*n*-hexano, 9:1), originando um sólido branco (78,5 mg, 76 %).

Ponto de fusão: 153 - 155° C

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.47 – 8.42 (m, 2H, NH e Ar- H_2), 8.35 (d, 1H, J = 1.2 Hz, Ar- H_5), 7.74 (dd, 1H, J = 9.0, 1.2 Hz, Ar- H_7), 7.66 (d, 1H, J = 9.0 Hz, Ar- H_8), 7.33 (t, 2H, J = 8.0 Hz, Ar- $H_{3''}$), 7.25 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ar- $H_{3'}$), 7.08 (t, 1H, J = 7.4 Hz, Ar- $H_{4''}$), 6.93 – 6.88 (m, 4H, Ar- $H_{2'}$ e Ar- $H_{2''}$), 3.72 (q, 2H, J = 6.7 Hz, NHCH_2CH_2), 2.92 (t, 2H, J = 7.4 Hz, NHCH_2CH_2).

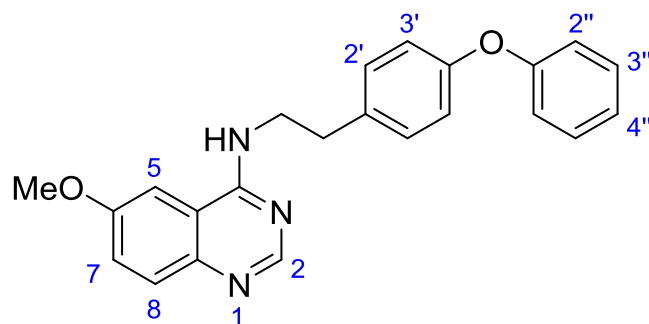
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 159.1 (C_{arom}), 157.4 (C_{arom}), 155.9 (CH_{arom}), 155.2 (C_{arom}), 148.1 (C_{arom}), 135.1 (C_{arom}), 133.4 (CH_{arom}), 130.7 (CH_{arom}), 130.4 (CH_{arom}), 130.1 (C_{arom}), 130.1 (CH_{arom}), 123.6 (CH_{arom}), 122.4 (CH_{arom}), 119.3 (CH_{arom}), 118.7 (CH_{arom}), 116.2 (C_{arom}), 42.6 (NHCH_2CH_2), 34.1 (NHCH_2CH_2).

IV (KBr): ν_{max} = 3250, 3109, 2967, 2855, 1429, 1381, 1289, 491 cm^{-1}

ESI-MS m/z (abund): 376,02 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100%)

Análise Elementar (%): Calculada ($\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}$), C 70,30; H 4,83; N 11,18. Experimental, C 70,45; H 4,92; N 10,97.

6.2.4.5. 6-Metoxi- N -(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (**127**)



À suspensão de quinazolona **119** (50 mg, 0,28 mmol, 1 equiv) com DIPEA (77 μL , 0,42 mmol, 1,5 equiv) em tolueno (1 mL) adicionou-se POCl_3 (41 μL , 0,43 mmol, 1,55 equiv) que a fez solubilizar numa solução amarela clara. A reacção e lavagem posterior decorreram de acordo com o procedimento

geral C para dar o crude do 6-metoxi-4-quinazolina (sólido acastanhado) que foi usado directamente no acoplamento final com o sal de TFA **110** (101 mg, 0,309 mmol, 1,1 equiv). A solubilização foi feita com 2 mL de DCM: i -PrOH (2:1), adicionando no fim, Et_3N (87 μL , 0,62 mmol, 2,2 equiv). A reacção e lavagem posteriores decorreram de igual forma ao procedimento geral C. Os 147 mg de crude alaranjado obtidos foram purificados por cromatografia flash (AcOEt/ n -hexano, 9:1), originando um sólido branco (74 mg, 70 %).

Ponto de fusão: 175 - 176° C

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.33 (s, 1H, Ar- H_2), 8.18 (t, 1H, J = 5.4 Hz, NH), 7.59 – 7.54 (m, 2H, Ar- H_8 e H_5), 7.36 – 7.28 (m, 3H, Ar- H_7 e Ar- $H_{3''}$), 7.23 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ar- $H_{3'}$),

7.05 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, Ar- $H4''$), 6.92 – 6.86 (m, 4H, Ar- $H2'$ e Ar- $H2''$), 3.81 (s, 3H, Ar- CH_3), 3.70 (q, 2H, $J = 6.8$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 2.90 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, $NHCH_2CH_2$).

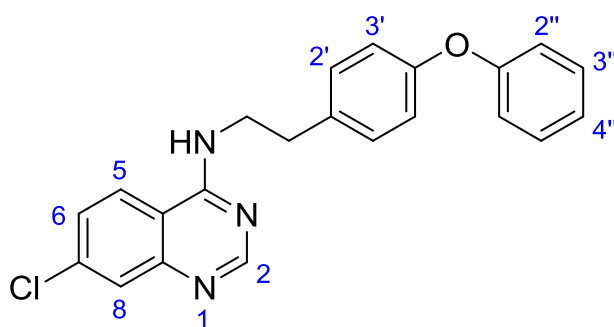
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 159.2 (C_{arom}), 157.5 (C_{arom}), 157.3 (C_{arom}), 155.2 (C_{arom}), 153.5 (CH_{arom}), 144.7 (C_{arom}), 135.3 (C_{arom}), 130.7 (CH_{arom}), 130.4 (CH_{arom}), 129.5 (CH_{arom}), 123.9 (CH_{arom}), 123.6 (CH_{arom}), 119.3 (CH_{arom}), 118.6 (CH_{arom}), 115.9 (C_{arom}), 102.5 (CH_{arom}), 56.3 (CH_3), 42.6 ($NHCH_2CH_2$), 34.4 ($NHCH_2CH_2$).

IV (KBr): $\nu_{max} = 3237, 2956, 2933, 1456, 1440, 1301, 1286, 1031\text{ cm}^{-1}$

ESI-MS m/z (abund): 372,17 $[M + H]^+$ (100%)

Análise Elementar (%): Calculada ($C_{23}H_{21}N_3O$), C 74,37; H 5,70; N 11,31. Experimental, C 74,27; H 5,79; N 11,04.

6.2.4.6. 7-Cloro-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (128)



À suspensão de quinazolona **121** (50 mg, 0,28 mmol, 1 equiv) com DIPEA (76 μ L, 0,42 mmol, 1,5 equiv) em tolueno (840 μ L) adicionou-se $POCl_3$ (40 μ L, 0,43 mmol, 1,55 equiv) que a fez solubilizar numa solução amarela clara. A reacção e lavagem posterior decorreram de acordo com o procedimento

geral C para dar o crude do 7-cloro-4-quinazolina (agulhas amarelas) que foi usado directamente no acoplamento final com o sal de TFA **110** (109 mg, 0,33 mmol, 1,2 equiv). A solubilização foi feita com 2,7 mL de DCM:*i*-PrOH (2:1), adicionando no fim, Et_3N (93 μ L, 0,67 mmol, 2,4 equiv). A reacção e lavagem posteriores decorreram de igual forma ao procedimento geral C. Os 113 mg de sólido alaranjado (crude) obtidos foram purificados por cromatografia flash (*n*-hexano/ $AcOEt$, 7:3), originando um sólido amarelo claro (84 mg, 81 %).

Ponto de fusão: 166 - 167° C

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.54 (t, 1H, $J = 5.2$ Hz, NH), 8.48 (s, 1H, Ar- $H2$), 8.25 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, Ar- $H5$), 7.71 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, Ar- $H8$), 7.56 (dd, 1H, $J = 9.0, 1.8$ Hz, Ar- $H6$), 7.36 (t, 2H, $J = 7.8$ Hz, Ar- $H3''$), 7.27 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ar- $H3'$), 7.11 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, Ar- $H4''$), 6.96 – 6.91 (m, 4H, Ar- $H2'$ e Ar- $H2''$), 3.75 (q, 2H, $J = 6.6$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 2.94 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, $NHCH_2CH_2$).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 159.2 (C_{arom}), 157.0 (C_{arom}), 156.4 (CH_{arom}), 154.8 (C_{arom}), 150.2 (C_{arom}), 137.1 (C_{arom}), 134.7 (C_{arom}), 130.3 (CH_{arom}), 130.0 (CH_{arom}), 126.3 (CH_{arom}), 126.0

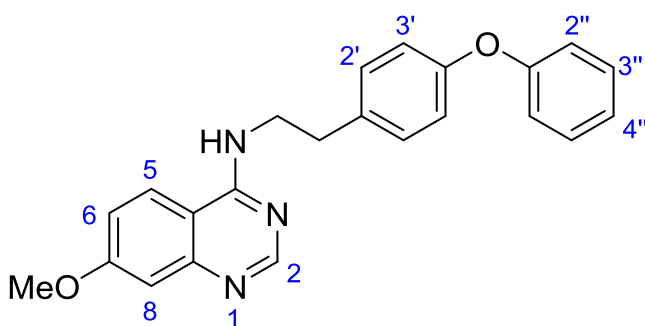
(CH_{arom}), 125.0 (CH_{arom}), 123.2 (CH_{arom}), 118.9 (CH_{arom}), 118.3 (CH_{arom}), 113.7 (C_{arom}), 42.2 (NHCH₂CH₂), 33.7 (NHCH₂CH₂).

IV (KBr): ν_{\max} = 3231, 3072, 2966, 1456, 1306, 1279, 628 cm⁻¹

ESI-MS *m/z* (abund): 376,14 [M + H]⁺ (100%)

Análise Elementar (%): Calculada (C₂₂H₁₈ClN₃O), C 70,30; H 4,83; N 11,18. Experimental, C 70,53; H 5,04; N 10,81.

6.2.4.7. 7-Metoxi-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (129)



À suspensão da quinazolona **122** (50 mg, 0,28 mmol, 1 equiv) com DIPEA (77 µL, 0,42 mmol, 1,5 equiv) em tolueno (1 mL) adicionou-se POCl₃ (41 µL, 0,43 mmol, 1,55 equiv) que a fez solubilizar numa solução amarela clara. A reacção e lavagem posterior decorreram de acordo com o procedimento

geral C para dar o crude do 7-metoxi-4-quinazolina (sólido amarelo claro) que foi usado directamente no acoplamento final com o sal de TFA **110** (112 mg, 0,34 mmol, 1,2 equiv). A solubilização foi feita com 2 mL de DCM:*i*-prOH (2:1), adicionando no fim, Et₃N (95 µL, 0,68 mmol, 2,4 equiv). A reacção e lavagem posteriores decorreram de igual forma ao procedimento geral C. Os 118 mg de crude alaranjado obtidos foram purificados por cromatografia flash (AcOEt/*n*-hexano, 8:2), originando um sólido branco (82 mg, 78 %).

Ponto de fusão: 142 - 144° C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.41 (s, 1H, Ar-*H*2), 8.22 (t, 1H, *J* = 5.2 Hz, *NH*), 8.11 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, Ar-*H*5), 7.36 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, Ar-*H*3''), 7.27 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, Ar-*H*3'), 7.13 – 7.06 (m, 3H, Ar-*H*6 e Ar-*H*7 / Ar-*H*4''), 6.94 (t, 4H, *J* = 7.6 Hz, Ar-*H*2' e Ar-*H*2''), 3.87 (s, 3H, Ar-CH₃), 3.73 (q, 2H, *J* = 6.7 Hz, NHCH₂CH₂), 2.93 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, NHCH₂CH₂).

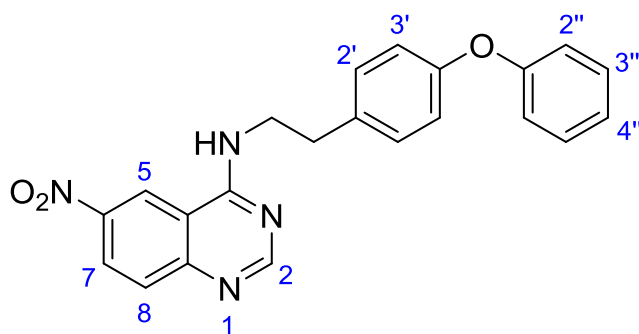
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1602.3 (C_{arom}), 159.1 (C_{arom}), 157.1 (C_{arom}), 155.7 (CH_{arom}), 154.82 (C_{qarom}), 151.4 (C_{arom}), 134.9 (C_{arom}), 130.3 (CH_{arom}), 130.0 (CH_{arom}), 124.2 (CH_{arom}), 123.2 (CH_{arom}), 118.9 (CH_{arom}), 118.3 (CH_{arom}), 116.7 (CH_{arom}), 109.2 (C_{arom}), 106.9 (CH_{arom}), 55.5 (CH_{3arom}), 42.1 (NHCH₂CH₂), 34.0 (NHCH₂CH₂).

IV (KBr): ν_{\max} = 3250, 3001, 2922, 1500, 1433, 1256, 1098 cm⁻¹

ESI-MS m/z (abund): 372,24 $[M + H]^+$ (100 %)

Análise Elementar (%): Calculada ($C_{23}H_{21}N_3O \cdot 0,1H_2O$), C 74,06; H 5,74; N 11,27.
Experimental ($C_{23}H_{21}N_3O$), C 74,40; H 5,77; N 10,90.

6.2.4.8. 6-Nitro-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (**130**)



À suspensão de quinazolona **120** (100 mg, 0,52 mmol, 1 equiv) com DIPEA (142 μ L, 0,79 mmol, 1,5 equiv) em tolueno (1,6 mL) adicionou-se $POCl_3$ (75 μ L, 0,81 mmol, 1,55 equiv) que a fez solubilizar numa solução amarela. A reacção e lavagem posterior decorreram de acordo com o procedimento

geral C para dar o crude do 6-nitro-4-quinazolina (sólido amarelo) que foi usado directamente no acoplamento final com o sal de TFA **110** (205 mg, 0,63 mmol, 1,2 equiv). A solubilização foi feita com 5 mL de DCM:*i*-PrOH (2:1), adicionando no fim, Et_3N (175 μ L, 1,26 mmol, 2,4 equiv). A reacção e lavagem posteriores decorreram de igual forma ao procedimento geral C. Os 200 mg de sólido amarelo (crude) obtidos foram purificados por cromatografia flash (AcOEt/*n*-hexano, 8:2), originando um sólido amarelo (120 mg, 60 %).

Ponto de fusão: 193 - 195° C

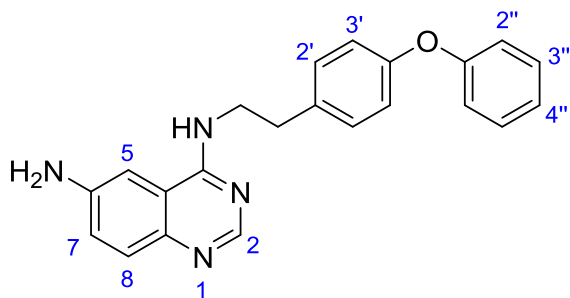
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.34 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, Ar-*H*5), 9.12 (t, 1H, $J = 5.2$ Hz, NH), 8.60 (s, 1H, Ar-*H*2), 8.47 (dd, 1H, $J = 9.0, 2.5$ Hz, Ar-*H*7), 7.83 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, Ar-*H*8), 7.36 (t, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ar-*H*3''), 7.29 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ar-*H*3'), 7.11 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, Ar-*H*4''), 6.96 – 6.92 (m, 4H, Ar-*H*2' e Ar-*H*2''), 3.80 (q, 2H, $J = 6.7$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 2.97 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, $NHCH_2CH_2$).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 160.3 (C_{arom}), 158.4 (CH_{arom}), 157.1 (C_{arom}), 154.9 (C_{arom}), 152.8 (C_{arom}), 144.1 (C_{arom}), 134.6 (C_{arom}), 130.4 (CH_{arom}), 130.1 (CH_{arom}), 129.2 (CH_{arom}), 126.4 (CH_{arom}), 123.3 (CH_{arom}), 120.6 (CH_{arom}), 118.9 (CH_{arom}), 118.3 (CH_{arom}), 114.1 (C_{arom}), 42.4 ($NHCH_2CH_2$), 33.6 ($NHCH_2CH_2$).

IV (KBr): $\nu_{max} = 3064, 2456, 2425, 2251, 1578, 1317$ cm^{-1}

ESI-MS m/z (abund): 387,31 $[M + H]^+$ (53%), 288,40 (100%)

6.2.4.9. *N*⁴-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4,6-diamina (**93**)



Solubilizada a quinazolina **130** (86 mg, 0,22 mmol, 1 equiv) em MeOH (concentração final 0,1 M) foi adicionado Pd/C-10% (15% da massa de **AD89**, 13 mg). A esta suspensão amarela foram realizadas 3 purgas com árgon e, de seguida, 3 purgas com hidrogénio gasoso. A mistura foi agitada à t.a. durante 4 h sob atmosfera de hidrogénio. Terminada

a reacção, foi realizada uma filtração a vácuo da mesma com celite, lavando várias vezes com MeOH (4x). O solvente foi evaporado a pressão reduzida, sendo os 95 mg de crude obtidos purificados por cromatografia flash (AcOEt/MeOH, 98:2), originando um sólido castanho claro (78 mg, 98 %).

Ponto de fusão: 182 - 185° C

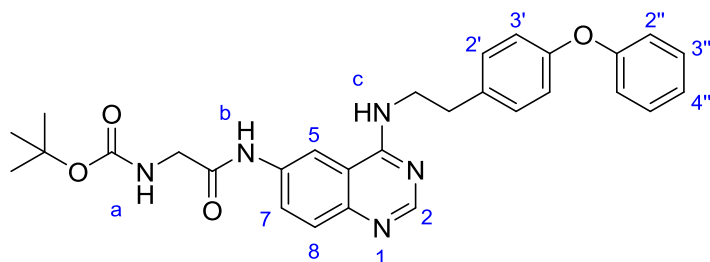
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.21 (s, 1H, Ar-*H*2), 7.79 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz, *NH*), 7.41 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar-*H*8), 7.37 (t, 2H, *J* = 8.0 Hz, Ar-*H*3''), 7.27 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, Ar-*H*3'), 7.15 – 7.08 (m, 2H, Ar-*H*7 e Ar-*H*4''), 7.02 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, Ar-*H*5), 6.95 (t, 4H, *J* = 8.6 Hz, Ar-*H*2' e Ar-*H*2''), 5.41 (s, 2H, Ar-*NH*2), 3.70 (q, 2H, *J* = 6.8 Hz, *NHCH*₂*CH*₂), 2.93 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, *NHCH*₂*CH*₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157.9 (C_{arom}), 157.0 (C_{arom}), 154.8 (C_{arom}), 150.8 (CH_{arom}), 146.6 (C_{arom}), 141.7 (C_{arom}), 135.0 (C_{arom}), 130.2 (CH_{arom}), 130.0 (CH_{arom}), 128.4 (CH_{arom}), 123.2 (CH_{arom}), 122.8 (CH_{arom}), 118.8 (CH_{arom}), 118.3 (CH_{arom}), 116.3 (C_{arom}), 101.2 (CH_{arom}), 42.1 (NHCH₂CH₂), 34.0 (NHCH₂CH₂).

IV (KBr): ν_{max} = 3395, 3093, 2919, 1455, 1426, 1321 cm⁻¹

ESI-MS *m/z* (abund): 357,18 [M + H]⁺ (100 %)

6.2.4.10. [*N*⁴-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4,6-diamina]-Gly-Boc (**145**)



A uma mistura de **93** (35 mg, 0,1 mmol, 1 equiv) e Boc-Gly-OH (19 mg, 0,11 mmol, 1,1 equiv) em THF seco (concentração final 0,4 M), foi adicionado EDC•HCl (38 mg, 0,2 mmol,

2 equiv) e a mistura foi agitada à t.a. durante 8 h sob atmosfera inerte. Terminada a reacção, foi adicionada água (10 mL) e extraiu-se a fase aquosa com AcOEt (3 x 10 mL). A fase orgânica foi

lavada com brine (20 mL), seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida. Os 59 mg de crude obtidos foram purificados por cromatografia flash (AcOEt/MeOH, 95:5), originando um sólido amarelo-torrado (20 mg, 40 %).

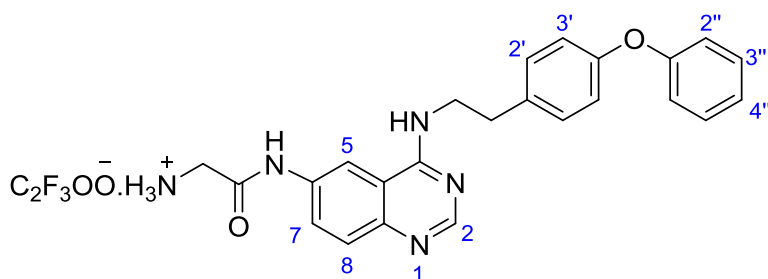
Ponto de fusão: 98 - 100° C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.00 (br s, 1H, NH_b), 8.56 (s, 1H, Ar-H₂), 8.13 (s, 1H, Ar-H₅), 7.67 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar-H₈), 7.47 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar-H₇), 7.32 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, Ar-H_{3''}), 7.23 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, Ar-H_{3'}), 7.08 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz, Ar-H_{4''}), 6.98 (t, 4H, *J* = 9.0 Hz, Ar-H_{2'} e Ar-H_{2''}), 6.23 (br s, 1H, NH_c), 5.40 (br s, 1H, NH_a), 3.98 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, CONHCH₂), 3.87 (q, 2H, *J* = 6.4 Hz, Ar-NHCH₂CH₂), 3.01 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, Ar-NHCH₂CH₂), 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.1 (C=ONH_b), 162.7 (C=ONH_a), 159.3 (C_{arom}), 157.6 (C_{arom}), 155.8 (C_{arom}), 154.3 (CH_{arom}), 145.4 (C_{arom}), 135.4 (C_{arom}), 134.1 (C_{arom}), 130.2 (CH_{arom}), 129.8 (CH_{arom}), 128.0 (CH_{arom}), 126.1 (CH_{arom}), 123.2 (CH_{arom}), 119.4 (CH_{arom}), 118.7 (CH_{arom}), 115.0 (C_{arom}), 110.9 (CH_{arom}), 81.2 (C_q), 42.98 (NHCH₂CH₂), 34.59 (NHCH₂CH₂), 29.83 (CH₂ glicina), 28.45 (CH₃).

IV (KBr): ν_{\max} = 3330, 3052, 2909, 2810, 1750, 1690, 1632, 1410, 1420, 1212, 1100 cm⁻¹

6.2.4.11. [N⁴-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4,6-diamina]-Gly-TFA (146)



O composto **145** (20 mg, 0,04 mmol, 1 equiv) foi desprotegido com TFA (309 μ L, 4 mmol, 100 equiv) em igual volume de DCM (309 μ L), tendo sido a reacção agitada durante 3 h à t.a.. Terminada a reacção, o

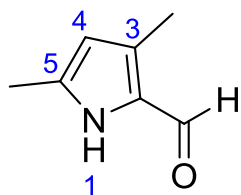
solvente foi evaporado e foram realizadas sucessivas co-evaporações com MeOH (4x) e depois com Et₂O (3x) até obter o correspondente sal de TFA sob a forma de sólido castanho claro (19 mg, 90%).

Ponto de fusão: 198 - 201° C

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 8.65 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, Ar-H₅), 8.00 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Ar-H₈), 7.75 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Ar-H₇), 7.29 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, Ar-H_{3''}), 7.24 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, Ar-H_{3'}), 7.06 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz, Ar-H_{4''}), 6.88 (t, 4H, *J* = 6.6 Hz, Ar-H_{2'} e Ar-H_{2''}), 4.03 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, Ar-NHCH₂CH₂), 3.94 (s, 2H, ⁺NH₃CH₂), 3.05 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz, Ar-NHCH₂CH₂).

6.2.5. Fluoróforo BODIPY-FL

6.2.5.1. 3,5-Dimetil-1*H*-pirrole-2-carbaldeído (133) ¹⁴⁸

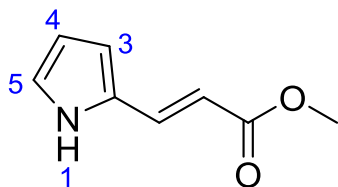


A uma solução de 2,4-dimetil-1*H*-pirrole (233 μ L, 2,26 mmol, 1 equiv) em DMF (concentração final 1,5 M) foi adicionado POCl₃ (280 μ L, 3 mmol, 1,3 equiv) a 15° C, passando a solução a ser amarela escura. A mistura foi agitada à t.a. durante 1,5 h sob atmosfera inerte. Terminada a reacção foi adicionada água (5 mL) e solução aquosa de KOH 20% lentamente (10 mL). De seguida, a fase aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 25 mL) e a fase orgânica foi lavada com brine, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida. Os 266 mg de crude (cristais amarelos escuros) obtidos foram purificados por cromatografia flash (*n*-hexano/AcOEt, 8:2), originando cristais amarelos (229 mg, 82 %).

Ponto de fusão: 86 – 87° C [lit. 88° C] ¹⁴⁸

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.46 (s, 2H, CHO e NH), 5.86 (s, 1H, Ar-*H*₄), 2.32 (s, 3H, 3-CH₃), 2.29 (s, 3H, 5-CH₃). O espectro está de acordo com a literatura. ¹⁴⁸

6.2.5.2. (*E*)-3-(1*H*-Pirrol-2-il)acrilato de metilo (131) ¹⁴⁶

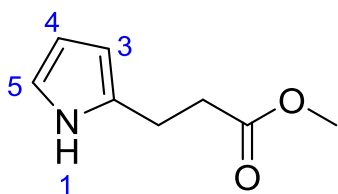


A uma solução de metil-2-(trifenilfosfanilideno) acetato (704 mg, 2,1 mmol, 2 equiv) em DCM (concentração final 0,43 M) foi adicionado 1*H*-pirrole-carbaldeído (100 mg, 1,05 mmol, 1 equiv). A mistura foi agitada à t.a. durante 24 h. Terminada a reacção foi realizada a adição de Et₂O/H₂O, 1:1 (20 mL), sendo posteriormente, a fase orgânica lavada com H₂O (2 x 15 mL), brine, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida. Os 784 mg de crude (óleo amarelo claro) obtidos foram purificados por cromatografia flash (*n*-hexano/AcOEt, 8:2), originando um sólido cor-de-rosa pálido (121 mg, 80 %).

Ponto de fusão: 60 – 62° C [lit. 59 - 62° C] ¹⁴⁷

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.54 (br s, 1H, NH), 7.45 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, CH=CH), 7.03 (s, 1H, Ar-*H*₅), 6.57 (s, 1H, Ar-*H*₃), 6.20 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, CH=CH), 6.15 (s, 1H, Ar-*H*₄), 3.66 (s, 3H, OCH₃).

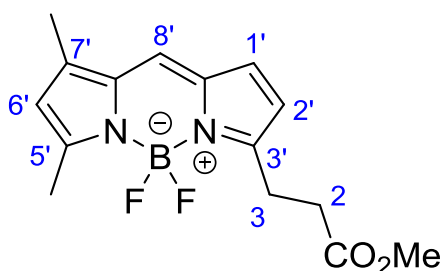
6.2.5.3. 3-(1*H*-Pirrol-2-il)propanoato de metilo (**132**)



A uma solução de **131** (293 mg, 1,94 mmol, 1 equiv) em MeOH (concentração final 0,2 M) foi adicionado Pd/C 10% (15% da massa de **132**, 44 mg). A esta suspensão amarela foram realizadas 3 purgas com árgon e, de seguida, 3 purgas com hidrogénio gasoso. A mistura foi agitada à t.a. durante 5 h sob atmosfera de hidrogénio. Terminada a reacção, foi realizada uma filtração a vácuo da mesma com celite, lavando várias vezes com MeOH (4x). O solvente foi evaporado a pressão reduzida, sendo o produto obtido (óleo incolor) seco sob vácuo (284 mg, 96 %).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.53 (br s, 1H, NH), 6.57 (s, 1H, Ar-*H*5), 5.86 (d, 1H, J = 2.5 Hz, Ar-*H*4), 5.72 (s, 1H, Ar-*H*3), 3.58 (s, 3H, OCH₃), 2.77 (t, 2H, J = 7.8 Hz, CH₂=CH₂), 2.59 (t, 2H, J = 7.6 Hz, CH₂=CH₂). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁴⁶

6.2.5.4. 3-[4,4-Difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-il]propanoato de metilo (**135**)¹⁴⁶



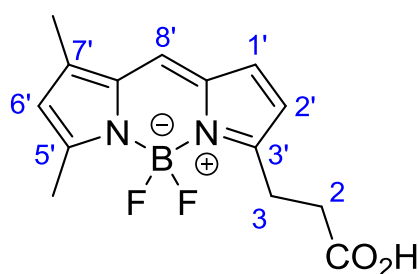
A uma solução de **132** (150 mg, 0,98 mmol, 1 equiv) e **133** (123 mg, 1,08 mmol, 1,1 equiv) em DCM (concentração final 0,13 M) sob agitação, foi adicionado POCl₃ (101 μ L, 1,08, 1,1 equiv) em 600 μ L de DCM a 0° C, que deixou a solução negra. A mistura foi agitada durante 30 minutos a 0° C e depois 6 h à t.a., sob ambiente inerte. Consumido o material de partida, foi adicionado, de seguida, BF₃•OEt₂ (483 μ L, 3,92 mmol, 4 equiv) e DIPEA (678 μ L, 3,92 mmol, 4 equiv) a 0° C. A solução vermelha escura resultante foi então agitada durante 12 h à t.a.. Terminada a reacção foi adicionada água (30 mL) à mistura e foi realizada uma filtração com um pouco de celite sob vácuo. O precipitado foi lavado com DCM (30 mL) e a fase aquosa foi separada e extraída com DCM (3 x 20 mL). A junção das fases orgânicas foi lavada com brine, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida. Os 330 mg de crude (sólido esverdeado brilhante) obtidos foram purificados por cromatografia flash (*n*-hexano/AcOEt, 8:2), originando cristais vermelhos (220 mg, 73%).

Ponto de fusão: 78 – 79° C [lit. 76 - 78° C]¹⁴⁶

^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.08 (s, 1H, Ar-*H*8'), 6.88 (d, 1H, J = 4.0 Hz, Ar-*H*1'), 6.26 (d, 1H, J = 4.0 Hz, Ar-*H*2'), 6.11 (s, 1H, Ar-*H*6'), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.29 (t, 2H, J = 7.6 Hz,

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$), 2.77 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$), 2.56 (s, 3H, Ar- CH_3), 2.25 (s, 3H, Ar- CH_3). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁴⁶

6.2.5.5. Ácido 3-[4,4-Difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-il]propiónico (136) - BODIPY-FL¹⁴⁶



A uma solução do éster metílico **135** (208 mg, 0,68 mmol, 1 equiv) em THF (concentração final 0,02 M) foi adicionada H_2O (20 mL) e HCl 37 % (13 mL). Após agitar durante 24 h à t.a., foi feita uma diluição com DCM (100 mL) e a fase aquosa foi extraída com DCM (3 x 60 mL). A junção das fases orgânicas foi lavada com brine, seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida. Os 205 mg de crude (sólido vermelho) obtidos foram purificados por cromatografia flash (DCM/MeOH, gradiente: 95:5 até 95:10), originando um sólido vermelho (154 mg, 78 %).

Ponto de fusão: 186 – 189° C [lit. 184 - 186° C]¹⁴⁶

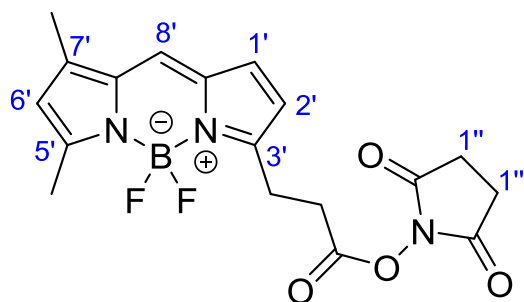
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.32 (br s, 1H, OH), 7.70 (s, 1H, Ar- $H8'$), 7.09 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz, Ar- $H1'$), 6.38 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz, Ar- $H2'$), 6.30 (s, 1H, Ar- $H6'$), 3.08 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 2.64 (t, 2H, $J = 7.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 2.47 (s, 3H, Ar- CH_3), 2.25 (s, 3H, Ar- CH_3). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁴⁶

^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 173.9 ($\text{C}=\text{O}$), 159.9 (C_{arom}), 157.4 (C_{arom}), 144.8 (C_{arom}), 135.0 (C_{arom}), 133.4 (C_{arom}), 129.3 (CH_{arom}), 125.9 (CH_{arom}), 120.9 (CH_{arom}), 117.0 (CH_{arom}), 32.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 24.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 15.0 (CH_3 arom), 11.5 (CH_3 arom).

IV: $\nu_{\text{max}} = 3447, 2954, 2924, 1710, 1400, 1396, 1249, 480 \text{ cm}^{-1}$

ESI-MS m/z (abund): 315,12 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

6.2.5.6. 3-[4,4-Difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-il]propanoato de succinimidilo (137) ¹⁷⁴



A uma mistura de **BODIPY-FL 136** (70 mg, 0,24 mmol, 1 equiv) em ACN anidro (concentração final 0,04 M), foi adicionada a *N*-hidroxisuccinimida (33 mg, 0,29 mmol, 1,2 equiv) e DCC (124 mg, 0,59 mmol, 2,5 equiv), respectivamente. A mistura foi agitada à t.a. durante 24 h, sob atmosfera inerte. Terminada a

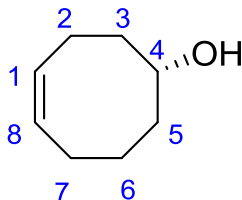
reação, o solvente foi evaporado a pressão reduzida num banho a 20° C. De seguida, o resíduo foi solubilizado em DCM (20 mL) e a fase orgânica foi lavada com água (2 x 15 mL) brine, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado. Os 205 mg de crude (sólido vermelho) obtidos foram purificados por cromatografia flash (DCM/AcOEt, 8:1), originando um sólido cor-de-laranja (46 mg, 47 %).

Ponto de fusão: 158 - 160° C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.10 (s, 1H, Ar-*H*8'), 6.89 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz, Ar-*H*1'), 6.33 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz, Ar-*H*2'), 6.13 (s, 1H, Ar-*H*6'), 3.38 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂CH₂CO), 3.08 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂CH₂CO), 2.84 (s, 4H, *H*1''), 2.57 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.25 (s, 3H, Ar-CH₃).

6.2.6. Função *trans*-cicloocteno (TCO) ¹⁵³

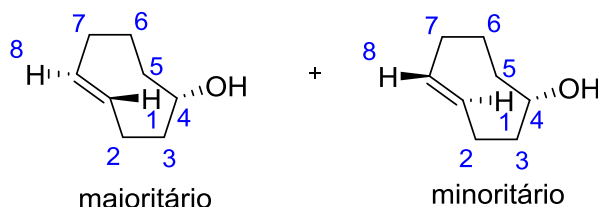
6.2.6.1. (Z)-Cicloocten-4-ol (**142**) ¹⁵²



A uma solução de 5,6-epoxycicloocteno (50 mg, 0,4 mmol, 1 equiv) em THF seco (concentração final 1M) foi adicionada, gota-a-gota, uma solução de LiAlH_4 em THF 1M (816 μL) a 0° C, sob atmosfera inerte. Após agitar à t.a. durante a noite, foi adicionada água (1 mL) gota-a-gota a 0° C, sendo a fase aquosa extraída com Et_2O (3 x 10 mL). A fase orgânica foi lavada com brine, seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida. Todo o processo foi realizado protegido da luz. Foram obtidos 45 mg de óleo incolor (89 %) que foram utilizados na reacção seguinte sem purificação adicional.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.74 – 5.54 (m, 2H), 3.85 – 3.78 (m, 1H), 2.35 – 2.23 (m, 1H,) 2.19 – 2.06 (m, 3H), 1.97 – 1.80 (m, 2H), 1.76 – 1.52 (m, 5H). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁵²

6.2.6.2. (E)-Cicloocten-4-ol (**143**) ¹⁵³



O (Z)-cicloocten-4-ol **142** (50 mg, 0,4 mmol, 1 equiv) e metil benzoato (50 μL , 0,4 mmol, 1 equiv) foram solubilizados em $\text{Et}_2\text{O}/n$ -hexano (9:1, concentração final 0,015 M) num tubo de quartzo à t.a., sob atmosfera inerte e protegido

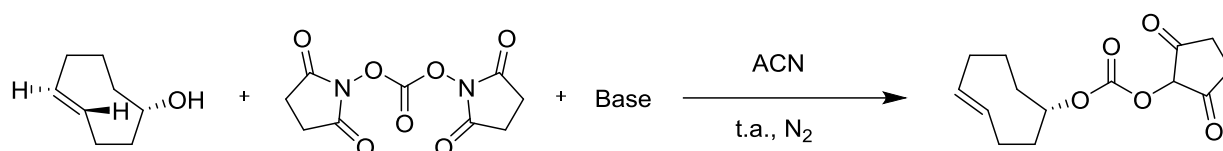
da luz, Figura 4.3a. O tubo de quartzo foi colocado num reactor “tipo” Rayonet conectado a uma coluna BUCHI (1 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento) empacotada com 2,5 cm de sílica gel e no topo foi colocada sílica de AgNO_3 10% (733 mg) e a uma bomba de HPLC preparativo BUCHI, como ilustrado na Figura 4.3b. Inicialmente, a coluna foi lavada com $\text{Et}_2\text{O}/n$ -hexano (9:1) e, de seguida, o fluxo da bomba foi ajustado para 2,5 mL/minuto. Ligado o reactor, a fotólise decorreu durante 7,5 h. Após este tempo, a coluna foi lavada com 20 mL de $\text{Et}_2\text{O}/n$ -Hexano (9:1). Toda a sílica usada na coluna foi agitada 15 minutos com NH_4OH (10 mL) e 15 minutos DCM (10 mL), respectivamente. De seguida, a fase aquosa foi extraída com DCM (2 x 15 mL) e a junção das fases orgânicas foi lavada com brine, seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida. Os 50 mg de crude (óleo incolor) obtidos foram purificados por cromatografia

flash (*n*-hexano/AcOEt, 8:2), originando dois óleos incolores, 25 mg do disatereoisómero maioritário e 9 mg do minoritário, num total de 39 mg (68 %).

Maioritário: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.63 – 5.53 (m, 1H), 5.43 – 5.32 (m, 1H), 3.51 – 3.40 (m, 1H), 2.27 – 2.35 (m, 3H), 2.01 – 1.86 (m, 4H), 1.73 – 1.48 (m, 4H).

Minoritário: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.66 – 5.44 (m, 2H), 4.06 – 4.00 (m, 1H), 2.44 – 2.31 (m, 1H), 2.28 – 2.18 (m, 2H), 2.16 – 2.01 (m, 2H), 1.92 – 1.58 (m, 4H), 1.36 – 1.07 (m, 2H). Os espectros estão de acordo com a literatura.¹⁵³

6.2.7. Tentativas do Éster activado do TCO ¹²⁰



Esquema 6.1. Reacção entre o TCO e o CDS, na presença de ACN e base (Et_3N ou DIPEA), sob atmosfera inerte e à t.a.

A uma mistura de TCO (1 equiv) e base em ACN anidro (concentração final 0,13 M), foi adicionado carbonato de *N, N'*-disuccinimidilo (CDS) – Esquema 6.1. A mistura foi agitada durante 40-48 h à t.a., sob atmosfera inerte e protegida da luz. O *work-up* da reacção consistiu na evaporação do solvente a pressão reduzida, solubilizando o resíduo resultante com Et_2O . A fase orgânica foi lavada com HCl 0,1 M (2x), brine, seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida. Quando foi necessária purificação foi realizada cromatografia flash (DCM/AcOEt, 9:1). Todos os passos foram realizados ao abrigo da luz.

Esta reacção foi alvo de várias tentativas alterando a base e os seus equivalentes, como se pode ver na tabela seguinte:

Tabela 6.1 Condições reaccionais das tentativas de reacção do Esquema 6.1.

	TCO (mg, 1 equiv)	CDS (mg, 2,5 equiv)	Base (mg, κ equiv)	Tempo de reacção (h)	Produto
Tentativa 1	21 mg	107 mg	Et_3N (84 μL , 3,6 equiv)	48 h	-
Tentativa 2	60 mg	305 mg	DIPEA (300 μL , 3,6 equiv)	44 h	-
Tentativa 3	12 mg	61 mg	Et_3N (15 μL , 1,1 equiv) + (15 μL , 1,1 equiv)	40 h	-

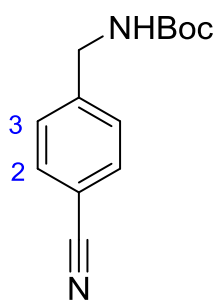
6.2.8. Tentativa de síntese da função tetrazina

6.2.8.1. Na ausência de catalisador¹¹⁹

A uma mistura de 4-(aminometil)benzonitrilo na forma de hidrocloreto (100 mg, 0,6 mmol, 1 equiv), acetato de formamidina (247 mg, 2,4 mmol, 4 equiv) e enxofre sublimado (19 mg, 0,6 mmol, 1 equiv) foi adicionada hidrazina mono-hidratada (461 μ L, 9,5 mmol, 16 equiv). A reacção foi agitada vigorosamente durante 24 h à t.a.. À medida que a reacção foi evoluindo formou-se uma suspensão amarela. Terminada a reacção foram adicionados 1,2 mL de ácido acético, sendo a suspensão filtrada sob vácuo. Ao filtrado foram adicionados 205 mg de NaNO₂ em 200 μ L de água a 0° C. Após a adição do nitrito de sódio a solução ficou cor-de-rosa à medida que se libertavam gases (gases de NO). O ácido acético foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo foi lavado com ACN (3 x 10 mL). A fase orgânica foi lavada com brine, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida. Os 204 mg de crude (óleo cor de rosa) obtidos foram purificados por cromatografia de fase reversa C₁₈ (gradiente H₂O+TFA 0,1 % – MeOH, 90:10/ 85:15/ 80:20 – 50:50). No entanto, após análise por RMN verificou-se que numa das fracções recolhidas correspondia ao produto.

6.2.8.2. Na presença de catalisador

Síntese do *terc*-butil-(4-cianobenzil)carbamato (138)¹⁵⁰



A uma solução de NaOH (71 mg, 1,78 mmol, 3 equiv) e Boc₂O (142 mg, 0,65 mmol, 1,1 equiv) em 500 μ L de H₂O foi adicionado 4-(aminometil)benzonitrilo (100 mg, 0,59 mmol, 1 equiv), tendo-se formado um precipitado branco. A mistura foi agitada à t.a. durante 16 h. Após esse tempo, a reacção foi filtrada e o precipitado lavado com 5 mL de H₂O. O precipitado recolhido (cristais brancos) secos na linha de vácuo, obtendo o produto pretendido (85 mg, 62 %).

Ponto de fusão: 186 – 189° C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.62 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ar-*H*₂), 7.39 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ar-*H*₃), 4.95 (br s, 1H, NH), 4.37 (d, 2H, J = 5.6 Hz, CH₂), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁵⁰

Tabela 6.2 – Condições reaccionais das tentativas para obter o composto **139**.

	Material de Partida (mg, equiv)	Acetato de Formamidina (mg, equiv)	Zn(OTf) ₂ (mg, equiv)	(NH ₂) ₂ ·H ₂ O (μL, equiv)	Co-solvente (M)	Tempo e Temperatura (h, ° C)
Tentativa 1	80 mg, 1 equiv	344 mg, 10 equiv	63 mg, 0,5 equiv	801 μL, 48 equiv	1,4-Dioxano, 0,85 M ¹⁵⁰	16 h, 60° C
Tentativa 2	54 mg, 1 equiv	194 mg, 10 equiv	71 mg, 1 equiv	452 μL, 48 equiv	1,4-Dioxano, 0,85 M	16 h, 60° C
Tentativa 3	50 mg, 1 equiv	224 mg, 10 equiv	78 mg, 1 equiv	660 μL, 60 equiv	DMF, 0,66 M ¹⁵¹	48 h, 30° C
Tentativa 4	50 mg, 1 equiv	224 mg, 10 equiv	78 mg, 1 equiv	660 μL, 60 equiv	DMF, 0,66 M	48 h, 30° C

Tentativa 1 (Tabela 6.2)

A uma mistura de **138** (80 mg, 0,34 mmol, 1 equiv), acetato de formamidina (344 mg, 3,31 mmol, 10 equiv) e triflato de zinco (63 mg, 0,17 mmol, 0,5 equiv) em 1,4-dioxano (400 μL) foi adicionada hidrazina mono-hidratada (801 μL, 16,5 mmol, 48 equiv). A mistura foi agitada durante 16 h a 60° C. À medida que a reacção evoluir, a mistura reaccional tornou-se numa solução amarela. Terminada a reacção foram adicionados 5 mL de AcOEt e 10 mL de HCl 1M, sendo a fase aquosa extraída com AcOEt (3 x 10 mL). A fase orgânica foi lavada com brine, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida. Ao resíduo resultante foram adicionados 10 mL de DCM:CH₃COOH (1:1) e posteriormente 575 mg de NaNO₂ (lentamente) a 0° C esperando 15 minutos. Após a adição do nitrito de sódio a solução ficou cor-de-rosa à medida que se libertavam gases (gases de NO). De seguida, a solução foi diluída com DCM (30 mL) e foram realizadas lavagens com solução aquosa de NaHCO₃ 5% (2 x 25 mL). A fase orgânica foi lavada com brine, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida, obtendo 95 mg de crude (óleo vermelho claro). A purificação foi realizada por cromatografia flash (n-hexano/AcOEt, 8:2). No entanto, após análise por RMN verificou-se que numa das fracções recolhidas correspondia ao produto.

Tentativa 2 (Tabela 6.2)

A uma mistura de **138** (45 mg, 0,19 mmol, 1 equiv), acetato de formamidina (194 mg, 1,86 mmol, 10 equiv) e triflato de zinco (71 mg, 0,20 mmol, 1 equiv) em 1,4-dioxano (300 μL) foi adicionada hidrazina mono-hidratada (452 μL, 9,31 mmol, 48 equiv). A mistura foi agitada durante 16 h a 60° C. À medida que a reacção evoluiu, a mistura reaccional tornou-se numa solução amarela. Terminada a reacção foram adicionados 5 mL de AcOEt e 10 mL de HCl 1M, sendo a fase aquosa

extraída com AcOEt (3 x 10 mL). A fase orgânica foi lavada com brine, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida. Ao resíduo resultante foram adicionados 10 mL de DCM:CH₃COOH (1:1) e posteriormente 250 mg de NaNO₂ (lentamente) a 0° C esperando 15 minutos. Após a adição do nitrito de sódio a solução ficou cor-de-rosa à medida que se libertavam gases (gases de NO). De seguida, a solução foi diluída com DCM (30 mL) e a fase orgânica foi lavada com solução aquosa de NaHCO₃ 5% (2 x 25 mL), brine, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida, obtendo-se 95 mg de crude (óleo vermelho claro). A purificação foi realizada por cromatografia flash (*n*-hexano/AcOEt, 8:2). No entanto, após análise por RMN verificou-se que numa das fracções recolhidas correspondia ao produto.

Tentativa 3 (Tabela 6.2)

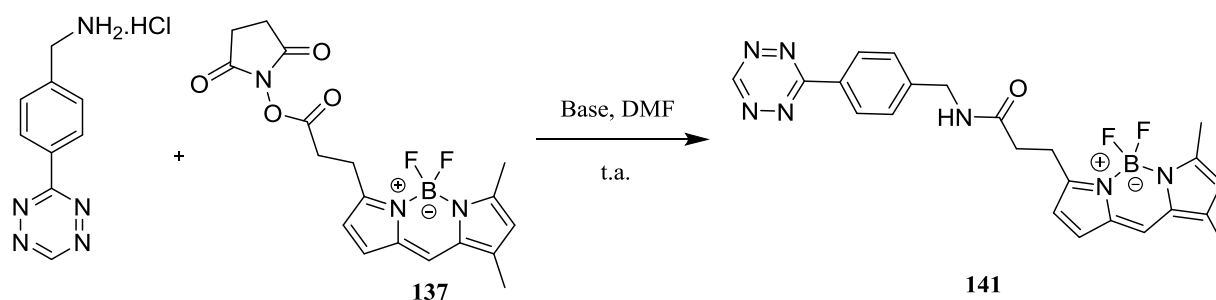
A uma mistura de **138** (50 mg, 0,22 mmol, 1 equiv), acetato de formamidina (224 mg, 2,15 mmol, 10 equiv) e triflato de zinco (78 mg, 0,22 mmol, 1 equiv) em DMF (330 µL) foi adicionada hidrazina mono-hidratada (660 µL). A mistura foi agitada durante 48 h a 30° C. À medida que a reacção evoluiu, a mistura reaccional tornou-se numa solução amarela. Terminada a reacção foram adicionados 5 mL de AcOEt e 10 mL de HCl 1M, sendo a fase aquosa extraída com AcOEt (3 x 10 mL). De seguida, adicionaram-se 300 mg de NaNO₂ (lentamente) a 0° C esperando 15 minutos. Após a adição do nitrito de sódio a solução ficou cor-de-rosa à medida que se libertavam gases (gases de NO). De seguida, a fase aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 10 mL). A fase orgânica foi lavada com brine, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida, originando um óleo cor-de-rosa. Após a análise por RMN verificou-se que não se formou o produto.

Tentativa 4 (Tabela 6.2)

A uma mistura de **138** (50 mg, 0,22 mmol, 1 equiv), acetato de formamidina (224 mg, 2,15 mmol, 10 equiv) e triflato de zinco (78 mg, 0,22 mmol, 1 equiv) em DMF (330 µL) foi adicionada hidrazina mono-hidratada tratada com crivos moleculares 3Å activados sob vácuo numa manta de aquecimento (660 µL). A mistura agitou durante 24 h a 30° C. À medida que a reacção evoluiu, a mistura reaccional tornou-se numa solução amarela. Terminada a reacção foram adicionados 5 mL de AcOEt e 10 mL de HCl 1M, sendo a fase aquosa extraída com AcOEt (3 x 10 mL). De seguida, foram adicionados 300 mg de NaNO₂ (lentamente) a 0° C esperando 15 minutos. Após a adição do nitrito de sódio a solução ficou cor-de-rosa enquanto se libertavam gases (gases de NO). De seguida, a fase aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 10 mL) e a fase orgânica foi lavada com brine,

seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado, originando um óleo cor-de-rosa. Mais uma vez pela análise por RMN verificou-se que não se formou o produto.

6.2.9. Tentativa de síntese do conjugado BODIPY FL-Tetrazina¹²⁰



Esquema 6.2 - Reacção química efectuada na tentativa de obter a molécula **141**. Nota: As bases usadas estão reportadas na Tabela 6.3.

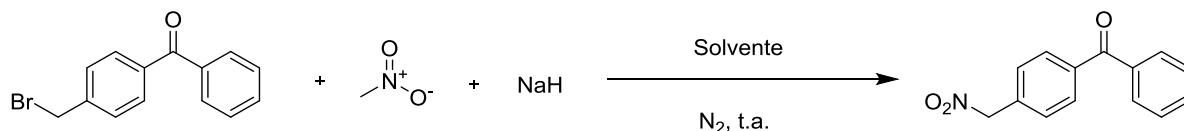
A uma mistura do éster de succinimida-BODIPY FL (1 equiv) e tetrazina comercial em forma de hidrocloreto (4 equiv) foi adicionado DMF anidro (concentração final 0,02 M) sob atmosfera inerte. De seguida, foi adicionada base (8 equiv) tendo-se verificado uma mudança de cor da mistura reaccional para vermelho escuro. A mistura foi agitada durante 24 h à t.a., sob atmosfera inerte e protegida da luz. Terminada a reacção foi adicionada solução aquosa de NaHCO₃ 5%, sendo esta extraída com DCM (4 x 10 mL). A fase orgânica foi lavada com brine, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida. O crude foi purificado por cromatografia de camada fina usando como eluente DCM/MeOH (95:5).

Tabela 6.3 – Condições reaccionais das tentativas do Esquema 6.2.

	BODIPY (mg, 1 equiv)	Tetrazina·HCl (mg, 4 equiv)	Base (mg, 8 equiv)	Tempo de reacção (h)	Observações
Tentativa 1	2,4 mg	5 mg	Et ₃ N (24 µL)	24 h	-
Tentativa 2	5,2 mg	10 mg	DIPEA (19 µL)	23 h	impuro

6.2.10. Tentativa de síntese de uma sonda fotoquímica baseada numa benzofenona

6.2.10.1. Tentativa com nitrometano (CH_3NO_2)¹⁷⁵



Esquema 6.3 - Tentativa de reacção entre a 4-(bromometil)benzofenona, o nirtometano, o NaH em solvente (THF, DMF, CH_3NO_2 – Tabela 6.4) sob atmosfera inerte e à t.a.

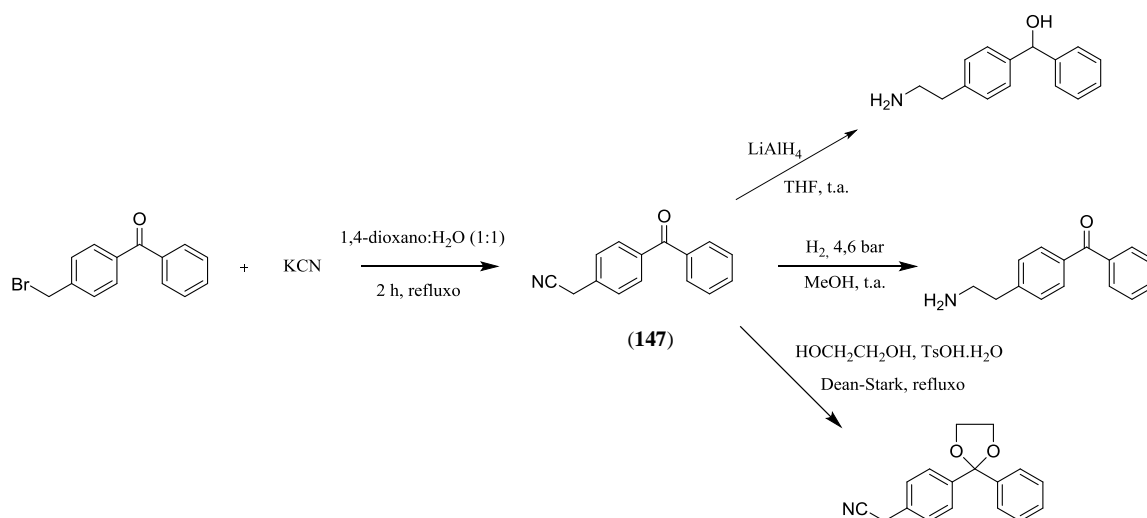
A uma suspensão de NaH 60% (70 mg, 1,82 mmol, 5 equiv) em 2 mL de solvente foi adicionado CH_3NO_2 (98 μL , 1,82 mmol, 5 equiv), gota-a-gota. A suspensão branca agitou durante 30 minutos à t.a., sob atmosfera inerte. Após esse tempo, foi adicionado a 4-(bromometil)benzofenona (100 mg, 0,36 mmol, 1 equiv) em 0,5 mL de solvente (**Tabela 6.4**). A mistura foi agitada à t.a. durante 1,5 h, sob atmosfera inerte.

O tratamento da reacção é feito com a adição de CHCl_3 (20 mL) e NH_4Cl (15 mL). A fase orgânica foi lavada com brine, seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente foi evaporado a pressão reduzida.

Tabela 6.4 - Condições reaccionais das tentativas de reacção do Esquema 6.3.

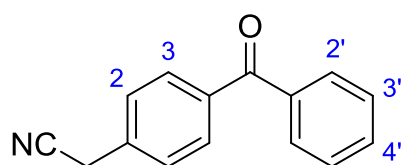
	Material de Partida (mg, 1 equiv)	CH_3NO_2 (mg, κ equiv)	NaH (mg, κ equiv)	Solvente (0,15 M)	Observações
Tentativa 1	100 mg	98 μL , 5 equiv	70 mg, 5 equiv	THF seco	Não reage
Tentativa 2	100 mg	98 μL , 5 equiv	70 mg, 5 equiv	DMF anidro	Óleo amarelo, não é o produto
Tentativa 3	100 mg	Usado como solvente, 2,5 mL	22 mg, 1,5 equiv	CH_3NO_2	Não reage

6.2.10.2. Tentativa com um via sintética alternativa



Esquema 6.4 - Tentativa de reacções numa via sintética diferente na síntese da sonda fotoquímica baseada na benzofenona.

Síntese do 2-(4-benzoilfenil)acetonitrilo (**147**)¹⁵⁵



A uma solução de 4-(bromometil)benzofenona (100 mg, 0,36 mmol, 1 equiv) em 1,4-dioxano (1 mL) foi adicionado KCN (26 mg, 0,4 mmol, 1 equiv). De seguida, foi adicionada água (1 mL) e a mistura foi agitada durante 2 h a refluxo. Terminada a reacção foi feita uma extracção com AcOEt (15 mL) e a fase orgânica foi lavada com brine, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida. Os 88 mg de crude (óleo vermelho) obtidos foram purificados por cromatografia flash (*n*-hexano/AcOEt, 7:3), originando um óleo amarelo (72 mg, 90 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.77 – 7.72 (m, 4H), 7.69 (t, 1H, J = 7.3 Hz, Ar-*H*4'), 7.59 – 7.54 (m, 4H), 4.20 (s, 2H, CH₂). O espectro está de acordo com a literatura.¹⁵⁵

Tentativa 1 (Esquema 6.4 - redução dos grupos nitrilo e carbonilo)

A uma solução de **147** (58 mg, 0,26 mmol, 1 equiv) em THF seco (concentração final 0,1M) foi adicionada, gota-a-gota, uma solução de LiAlH₄ em THF 1M (816 μ L) a 0° C, sob atmosfera inerte. Após agitar à t.a. durante a noite, foi adicionada água (1 mL) gota-a-gota a 0° C, sendo a fase aquosa extraída com Et₂O (3 x 10 mL). A fase orgânica foi lavada com brine, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida. Pela análise por RMN verificou-se que não se formou o produto.

Tentativa 2 (Esquema 6.4 - redução do grupo nitrilo)

A uma solução de **147** (58 mg, 0,26 mmol, 1 equiv) em MeOH (concentração final 0,1 M), foi adicionado Pd-C 10% (9 mg, 15 % da massa de **147**). A esta suspensão foram realizadas 3 purgas com argon e, de seguida, 3 purgas com hidrogénio gasoso. A mistura foi agitada à t.a. durante 24 h à pressão de 4,6 bar. O material de partida não foi consumido.

Tentativa 3 (Esquema 6.4 - Protecção do grupo carbonilo)

A uma mistura de **147** (55 mg, 0,25 mmol, 1 equiv) e TsOH•H₂O (1,4 mg, 0,08 mmol, 0,3 equiv) em tolueno (5 mL), foi adicionado etileno glicol (21 µL, 0,37 mmol, 1,5 equiv). A solução foi agitada sob atmosfera inerte, durante 24 h a refluxo com recurso a um Dean-Stark. Mais uma vez o material de partida não reagiu.

6.3. Estudos Biológicos

6.3.1. Ensaios de actividade biológica *in vitro* na FH

Células de uma linha celular do hepatoma humano (Huh-7) foram tratadas num meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal de bovino, 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais, 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina, 1% (v/v) de glutamina e 10 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico (HEPES), pH = 7 e mantido a 37° C com 5% de CO₂.

A inibição da fase hepática da infecção foi medida através da intensidade de luminescência em células Huh-7 infectadas com uma linha do *P. berghei* que expressa luciferase, *PbGFP-Luc_{con}*, como anteriormente descrito.¹⁴¹

Resumidamente, numa placa de 96 poços foram inoculadas 12x10³ células/poço no dia anterior ao tratamento com o fármaco e infecção. Os compostos testados foram preparados da seguinte forma: foram obtidas soluções de *stock* através da dissolução dos compostos previamente pesados (com precisão) em MeOH, e posteriormente, foram feitas diluições até à concentração desejada.

O meio anterior foi substituído por um meio fresco contendo a concentração apropriada de cada composto 1 h antes da infecção. Os esporozoítos (10000 spz/poço) frescos, obtidos através da ruptura das glândulas salivares de mosquitos fêmeas *Anopheles stephensi* infectados, foram adicionados aos poços 1 h após a adição dos compostos. De seguida, foi realizada uma centrifugação a 1700 g durante 5 minutos. Ao fim de 24 h após a infecção, o meio foi uma vez mais substituído pela concentração apropriada de cada composto estudado. A inibição do

desenvolvimento do parasita no fígado foi medida 48 h após a infecção. O efeito dos compostos sobre a viabilidade de células Huh-7 foi avaliada pelo ensaio AlamarBlue (Invitrogen, UK), utilizando o protocolo do fabricante. A análise de regressão não-linear foi utilizada para ajustar os resultados normalizados das curvas de dose-resposta, e os valores IC₅₀ foram determinados utilizando o *software* SigmaPlot.

6.3.2. Ensaios de actividade biológica *in vitro* na FS¹⁴⁰

Neste ensaio, foram utilizados dois controlos: um controlo de crescimento (sem compostos – controlo livre de fármacos) e um controlo não-infectado (eritrócitos sem parasita – controlo não infectado). Nos ensaios dos compostos, foi usada cloroquina, a uma concentração de 100 nM (duas determinações de IC₅₀), como controlo.

Foram usadas culturas sincronizadas da fase anelar de *P. falciparum* 3D7. Os compostos (solução *stock* 5 mM) foram preparados, duas vezes, em meio de cultura malárica (MCM), à concentração a ser testada. Numa placa de 96 poços, 100 µL de composto e uma suspensão de sangue, previamente preparada da cultura sincronizada a 1% de parasitemia e 5% de hematócrito, foram adicionados às respectivas placas. Assim, cada poço tinha um hematócrito final de 2,5%, 1% de parasitemia e a concentração de composto a testar (1 e 3 µM). O MCM foi adicionado ao controlo livre de fármaco e ao controlo não infectado.

As placas foram incubadas durante 48 h, a 37° C numa atmosfera de 5% de CO₂ e as medições por citometria de fluxo foram realizadas às 0 h, 24 h e 48 h de incubação. Em cada ponto de tempo, a percentagem de episódios de despolarização e de parasitemia (falsos positivos com *SYBR green*) foi avaliada. Para medir a parasitemia, as amostras foram coradas com o comercial SYBR® Green I (previamente diluído 1:10000 em PBS), na proporção de 1:10 (5 mL da amostra de cada poço e 50 mL de corante). De seguida, incubou-se durante 20 minutos à t.a. e protegido da luz. Após este período de incubação foram adicionados 900 µL de tampão fosfato salino a cada amostra antes da análise no CyFlow® (Partec®, Münster, Germany) usando o *software* FlowJo.

6.3.3. Ensaios de toxicidade *in vitro*

A toxicidade foi avaliada usando MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) para testar a viabilidade celular.¹⁴² Resumidamente, uma dia antes da experiência, as células NIH3T3 (linha celular de fibroblastos embrionários de ratinho, ATCC CRL-1658) ou células HEK293T (células embrionárias epiteliais do rim humano, ATCC CRL-11268) foram colocadas em placas de 96 poços em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal de bovino,

100 unidades de penicilina G (sal de sódio), 100 µg de sulfato de streptomicina e 2 mM de L-glutamina, a uma concentração que permita o crescimento das células de forma exponencial durante todo o ensaio. Os compostos a serem testados são diluídos em DMSO e em seguida são feitas diluições pelos meios de cultura. Os compostos a diferentes concentrações em DMSO são adicionados às células. As células são incubadas a 37° C em atmosfera húmida (5% de CO₂). Após 48 h, os meios de cultura contendo DMSO (para as células controlo) ou solução de composto do ensaio (para as células do ensaio) foi removido e substituído por meio fresco contendo corante MTT. Após 3 h de incubação o meio completo foi removido e os cristais de formazano foram solubilizados e extraiu-se com DMSO. Após 15 minutos à t.a., a absorvância foi medida a 570 nm num leitor de microplacas. A percentagem de viabilidade das células foi determinada para cada concentração de composto testado, como descrito anteriormente.¹⁴² A concentração de composto que reflecte a inibição de 50% de viabilidade das células (IC₅₀) foi determinada a partir da curva de concentração-resposta. Isto foi feito através da aplicação do procedimento de regressão não-linear para os dados de resposta da concentração, utilizando o *software* GraphPad Prism.

Capítulo 7

Bibliografía

- (1) Hafalla, J. C. R.; Matuschewski, K.; Mueller, A. K. Malaria: immunity. *eLS* **2007**.
- (2) Okwa, O. O.: MALARIA PARASITES. INTEC OPEN, **2012**.
- (3) WHO. **2012**. World Malaria Report **2012**. WHO Press.
- (4) Parrington, J.; Coward, K.: *Comparative genomics and proteomics in drug discovery*; Taylor & Francis Group, **2007**. pp. Chapter 3.
- (5) Antunes, F.: *Manual sobre Doenças Infecciosas*; PERMANYER PORTUGAL, **2012**. pp. 492-497.
- (6) www.globalhealthfacts.org ; visitado a 10 de Agosto de 2013.
- (7) <http://www.who.int/gho/malaria/en/index.html> ; visitado a 10 de Agosto de 2013.
- (8) Cohen, A.; Dumetre, A.; Azas, N. A Decade of Plasmodium falciparum Metabolic Pathways of Therapeutic Interest to Develop New Selective Antimalarial Drugs. *Mini Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1340-1347.
- (9) Petersen, I.; Eastman, R.; Lanzer, M. Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 1551-1562.
- (10) Biamonte, M. A.; Wanner, J.; Le Roch, K. G. Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2829-2843.
- (11) Roberts, L.; Enserink, M. Did they really say... eradication? *Science* **2007**, *318*, 1544-1545.
- (12) N Burrows, J.; Chibale, K.; NC Wells, T. The state of the art in anti-malarial drug discovery and development. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 1226-1254.
- (13) Arora, N.; K Banerjee, A. New Targets, New Hope: Novel Drug Targets for Curbing Malaria. *Mini Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 210-226.
- (14) Cohen, J. M.; Smith, D. L.; Cotter, C.; Ward, A.; Yamey, G.; Sabot, O. J.; Moonen, B. Malaria resurgence: a systematic review and assessment of its causes. *Malar. J.* **2012**, *11*, 122.
- (15) González, R.; Ataíde, R.; Naniche, D.; Menéndez, C.; Mayor, A. HIV and malaria interactions: where do we stand? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2012**, *10*, 153-165.
- (16) Schlitzer, M. Malaria chemotherapeutics part I: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 944-986.
- (17) Chauhan, V. Vaccines for malaria-prospects and promise. *Curr. Sci.* **2007**, *92*, 1525.
- (18) Dhanawat, M.; Das, N.; Nagarwal, R. C.; Shrivastava, S. Antimalarial drug development: past to present scenario. *Mini Rev. Med. Chem.* **2009**, *9*, 1447-1469.
- (19) Borrmann, S.; Matuschewski, K. Targeting *Plasmodium* liver stages: better late than never. *Trends Mol. Med.* **2011**, *17*, 527-536.
- (20) Miller, L. H.; Ackerman, H. C.; Su, X.-z.; Wellems, T. E. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 156-167.
- (21) Tuteja, R. Malaria– an overview. *FEBS J.* **2007**, *274*, 4670-4679.
- (22) Prudêncio, M.; Rodriguez, A.; Mota, M. M. The silent path to thousands of merozoites. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 849-856.
- (23) Mazier, D.; Rénia, L.; Snounou, G. A pre-emptive strike against malaria's stealthy hepatic forms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *8*, 854-864.
- (24) Oh, S.; Chishti, A.: Host receptors in malaria merozoite invasion. In *Malaria: Drugs, Disease and Post-genomic Biology*; Springer, **2005**; pp 203-232.

- (25) Hemmer, C. J.; Holst, F. G. E.; Kern, P.; Chiwakata, C. B.; Dietrich, M.; Reisinger, E. C. Stronger host response per parasitized erythrocyte in *Plasmodium vivax* or ovale than in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trop. Med. Int. Health* **2006**, *11*, 817-823.
- (26) Whitten, M.; Shiao, S.-H.; Levashina, E. Mosquito midguts and malaria: cell biology, compartmentalization and immunology. *Parasite Immunol.* **2006**, *28*, 121-130.
- (27) Alemu, A.; Shiferaw, Y.; Addis, Z.; Mathewos, B.; Birhan, W. Effect of malaria on HIV/AIDS transmission and progression. *Parasites & vectors* **2013**, *6*, 18.
- (28) Björkman, A. Malaria associated anaemia, drug resistance and antimalarial combination therapy. *Int. J. Parasitol.* **2002**, *32*, 1637-1643.
- (29) Mohandas, N.; An, X. Malaria and human red blood cells. *Med. Microbiol. Immunol.* **2012**, *201*, 593-598.
- (30) Klein, E. Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2013**.
- (31) Anthony, M. P.; Burrows, J. N.; Duparc, S.; Moehrle, J.; Wells, T. N. The global pipeline of new medicines for the control and elimination of malaria. *Malar. J.* **2012**, *11*, 18.
- (32) Svennas, K. L.; Macdonald, S. J.; Willis, P. A. Small molecule anti-malarial patents: a review (January 2010-June 2011). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22*, 607-643.
- (33) Dandapani, S.; Comer, E.; Duvall, J. R.; Munoz, B. Hits, leads and drugs against malaria through diversity-oriented synthesis. *Future Med. Chem.* **2012**, *4*, 2279-2294.
- (34) Vangapandu, S.; Jain, M.; Kaur, K.; Patil, P.; Patel, S. R.; Jain, R. Recent advances in antimalarial drug development. *Med. Res. Rev.* **2007**, *27*, 65-107.
- (35) Greenwood, D. History of Antimalarial Agents. *eLS* **2009**.
- (36) Oliaro, P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacol. Ther.* **2001**, *89*, 207-219.
- (37) Tekwani, B. L.; Walker, L. A. 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2006**, *19*, 623-631.
- (38) Henry, M.; Alibert, S.; Rogier, C.; Barbe, J.; Pradines, B. Inhibition of efflux of quinolines as new therapeutic strategy in malaria. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 563-578.
- (39) Garcia Linares, G. E.; Rodriguez, J. B. Current status and progresses made in malaria chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 289-314.
- (40) Li, J.; Zhou, B. Biological actions of artemisinin: insights from medicinal chemistry studies. *Molecules* **2010**, *15*, 1378-1397.
- (41) Padmanaban, G.; Nagaraj, A. V.; Rangarajan, P. N. Drugs and drug targets against malaria. *Curr. Sci.* **2007**, *92*, 1545-1555.
- (42) Prabhu, P.; Patravale, V. Novel targets for malaria therapy. *Curr. Drug Targets* **2011**, *12*, 2129-2143.
- (43) Martinelli, A.; Moreira, R.; Cravo, P. Malaria combination therapies: advantages and shortcomings. *Mini Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 201-212.
- (44) Wu, T.; S Nagle, A.; K Chatterjee, A. Road towards new antimalarials-overview of the strategies and their chemical progress. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 853-871.
- (45) Sa, J. M.; Chong, J. L.; Wellems, T. E. Malaria drug resistance: new observations and developments. *Essays Biochem.* **2011**, *51*, 137-160.
- (46) Parija, S.; Praharaj, I. Drug resistance in malaria. *Indian J. Med. Microbiol.* **2011**, *29*, 243.

- (47) Avery, M. A.; Choi, S.-R.; Mukherjee, P. The fight against drug-resistant malaria: novel plasmodial targets and antimalarial drugs. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 161-171.
- (48) Cravo, P.; Culleton, R.; Afonso, A.; Ferreira, I.; Do Rosario, V. Mechanisms of drug resistance in malaria: current and new challenges. *Antimicrob. Agents Med. Chem.* **2006**, *5*, 63-73.
- (49) Hyde, J. E. Drug-resistant malaria. *Trends Parasitol.* **2005**, *21*, 494-498.
- (50) Turschner, S.; Efferth, T. Drug resistance in Plasmodium: natural products in the fight against malaria. *Mini Rev. Med. Chem.* **2009**, *9*, 206-214.
- (51) Derbyshire, E. R.; Mota, M. M.; Clardy, J. The next opportunity in anti-malaria drug discovery: the liver stage. *PLoS Path.* **2011**, *7*, e1002178.
- (52) Rodrigues, T.; Prudêncio, M.; Moreira, R.; Mota, M. M.; Lopes, F. Targeting the liver stage of malaria parasites: a yet unmet goal. *J. Med. Chem.* **2011**, *55*, 995-1012.
- (53) Gardner, M. J.; Hall, N.; Fung, E.; White, O.; Berriman, M.; Hyman, R. W.; Carlton, J. M.; Pain, A.; Nelson, K. E.; Bowman, S. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2002**, *419*, 498-511.
- (54) Vaughan, A. M.; O'Neill, M. T.; Tarun, A. S.; Camargo, N.; Phuong, T. M.; Aly, A. S.; Cowman, A. F.; Kappe, S. H. Type II fatty acid synthesis is essential only for malaria parasite late liver stage development. *Cell. Microbiol.* **2009**, *11*, 506-520.
- (55) Schlitzer, M. Antimalarial drugs—what is in use and what is in the pipeline. *Arch. Pharm.* **2008**, *341*, 149-163.
- (56) Vale, N.; Moreira, R.; Gomes, P. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 937-953.
- (57) Schmidt, L. Relationships between chemical structures of 8-aminoquinolines and their capacities for radical cure of infections with *Plasmodium cynomolgi* in rhesus monkeys. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1983**, *24*, 615-652.
- (58) LaMontagne, M. P.; Blumbergs, P.; Strube, R. E. Antimalarials. 14. 5-(Aryloxy)-4-methylprimaquine analogs. A highly effective series of blood and tissue schizonticidal agents. *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 1094-1097.
- (59) Jain, M.; Khan, S. I.; Tekwani, B. L.; Jacob, M. R.; Singh, S.; Singh, P. P.; Jain, R. Synthesis, antimalarial, antileishmanial, and antimicrobial activities of some 8-quinolinamine analogues. *Biorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4458-4466.
- (60) Shiraki, H.; Kozar, M. P.; Melendez, V.; Hudson, T. H.; Ohrt, C.; Magill, A. J.; Lin, A. J. Antimalarial activity of novel 5-aryl-8-aminoquinoline derivatives. *J. Med. Chem.* **2010**, *54*, 131-142.
- (61) Capela, R.; Cabal, G. G.; Rosenthal, P. J.; Gut, J.; Mota, M. M.; Moreira, R.; Lopes, F.; Prudêncio, M. Design and evaluation of primaquine-artemisinin hybrids as a multistage antimalarial strategy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 4698-4706.
- (62) Carraz, M.; Jossang, A.; Rasoanaivo, P.; Mazier, D.; Frappier, F. Isolation and antimalarial activity of new morphinan alkaloids on *Plasmodium yoelii* liver stage. *Biorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6186-6192.
- (63) Carraz, M.; Jossang, A.; Franetich, J.-F.; Siau, A.; Ciceron, L.; Hannoun, L.; Sauerwein, R.; Frappier, F.; Rasoanaivo, P.; Snounou, G. A plant-derived morphinan as a novel lead compound active against malaria liver stages. *PLoS Med.* **2006**, *3*, e513.
- (64) Hughes, L. M.; Lanteri, C. A.; O'Neil, M. T.; Johnson, J. D.; Gribble, G. W.; Trumpower, B. L. Design of anti-parasitic and anti-fungal hydroxy-naphthoquinones that are less susceptible to drug resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2011**, *177*, 12-19.

- (65) Nam, T.-g.; McNamara, C. W.; Bopp, S.; Dharia, N. V.; Meister, S.; Bonamy, G. M.; Plouffe, D. M.; Kato, N.; McCormack, S.; Bursulaya, B. A chemical genomic analysis of decoquinatone, a *Plasmodium falciparum* cytochrome b inhibitor. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1214-1222.
- (66) LaCrue, A. N.; Sáenz, F. E.; Cross, R. M.; Udenze, K. O.; Monastyrskyi, A.; Stein, S.; Mutka, T. S.; Manetsch, R.; Kyle, D. E. 4-(1*H*)-Quinolones with liver stage activity against *Plasmodium berghei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 417-424.
- (67) MI-ICHI, F.; MIYADERA, H.; KOBAYASHI, T.; TAKAMIYA, S.; WAKI, S.; IWATA, S.; SHIBATA, S.; KITA, K. Parasite mitochondria as a target of chemotherapy: inhibitory effect of licochalcone A on the *Plasmodium falciparum* respiratory chain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2005**, *1056*, 46-54.
- (68) Chen, M.; Theander, T. G.; Christensen, S.; Hviid, L.; Zhai, L.; Kharazmi, A. Licochalcone A, a new antimalarial agent, inhibits in vitro growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and protects mice from *P. yoelii* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 1470-1475.
- (69) Rodrigues, T.; da Cruz, F. P.; Lafuente-Monasterio, M. J.; Gonçalves, D.; Ressurreição, A. S.; Siteo, A. R.; Bronze, M. R.; Gut, J.; Schneider, G.; Mota, M. M. Quinolin-4(1*H*)-imines are Potent Antiplasmodial Drugs Targeting the Liver Stage of Malaria. *J. Med. Chem.* **2013**.
- (70) Ressurreição, A. S.; Gonçalves, D.; Siteo, A. R.; Albuquerque, I. S. S.; Gut, J.; Góis, A.; Gonçalves, L. M.; Bronze, M. R.; Hanscheid, T.; Biagini, G. A. Structural Optimization of Quinolone-4(1*H*)-imines as Dual-Stage Antimalarials: Toward Increased Potency and Metabolic Stability. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7679-7690.
- (71) Singh, A. P.; Surolia, N.; Surolia, A. Triclosan inhibit the growth of the late liver-stage of *Plasmodium*. *IUBMB life* **2009**, *61*, 923-928.
- (72) KAPPE, S.; TARUN, A.; VAUGHAN, A.: Malaria Liver Stage Drugs. WO Patent 2,008,147,826, 2008.
- (73) Singh, A. P.; Zhang, Y.; No, J.-H.; Docampo, R.; Nussenzweig, V.; Oldfield, E. Lipophilic bisphosphonates are potent inhibitors of *Plasmodium* liver-stage growth. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 2987-2993.
- (74) Lauinger, I. L.; Vivas, L.; Perozzo, R.; Stairiker, C.; Tarun, A.; Zloh, M.; Zhang, X.; Xu, H.; Tonge, P. J.; Franzblau, S. G. Potential of Lichen Secondary Metabolites against *Plasmodium* Liver Stage Parasites with FAS-II as the Potential Target. *J. Nat. Prod.* **2013**.
- (75) Schrader, F. C.; Glinca, S.; Sattler, J. M.; Dahse, H. M.; Afanador, G. A.; Prigge, S. T.; Lanzer, M.; Mueller, A. K.; Klebe, G.; Schlitzer, M. Novel Type II Fatty Acid Biosynthesis (FAS II) Inhibitors as Multistage Antimalarial Agents. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 442-461.
- (76) Derbyshire, E. R.; Prudêncio, M.; Mota, M. M.; Clardy, J. Liver-stage malaria parasites vulnerable to diverse chemical scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 8511-8516.
- (77) Adovelande, J.; Schrével, J. Carboxylic ionophores in malaria chemotherapy: the effects of monensin and nigericin on *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium vinckei petteri* in vivo. *Life Sci.* **1996**, *59*, PL309-PL315.
- (78) Gumila, C.; Ancelin, M.-L.; Delort, A.-M.; Jeminet, G.; Vial, H. J. Characterization of the potent in vitro and in vivo antimalarial activities of ionophore compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 523-529.
- (79) Parvanova, I.; Epiphany, S.; Fauq, A.; Golde, T. E.; Prudêncio, M.; Mota, M. M. A small molecule inhibitor of signal peptide peptidase inhibits *Plasmodium* development in the liver and decreases malaria severity. *PLoS One* **2009**, *4*, e5078.
- (80) Rodrigues, T.; Ressurreição, A. S.; da Cruz, F. P.; Albuquerque, I. S.; Gut, J.; Carrasco, M. P.; Gonçalves, D.; Guedes, R. C.; dos Santos, D. J.; Mota, M. M. Flavones as isosteres of 4(1*H*)-quinolones: Discovery of ligand efficient and dual stage antimalarial lead compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 872-880.

- (81) Pérez, B.; Teixeira, C.; Gomes, A. S.; Albuquerque, I. S.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Prudêncio, M.; Gomes, P. In vitro efficiency of 9-(N-cinnamoylbutyl) aminoacridines against blood-and liver-stage malaria parasites. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**.
- (82) Perez, B. C.; Teixeira, C.; Albuquerque, I. S.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Gomes, J. R. B.; Prudencio, M.; Gomes, P. N-Cinnamoylated Chloroquine Analogues as Dual-Stage Antimalarial Leads. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 556-567.
- (83) Mahmoudi, N.; Garcia-Domenech, R.; Galvez, J.; Farhati, K.; Franetich, J.-F.; Sauerwein, R.; Hannoun, L.; Derouin, F.; Danis, M.; Mazier, D. New active drugs against liver stages of Plasmodium predicted by molecular topology. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 1215-1220.
- (84) Derbyshire, E. R.; Mazitschek, R.; Clardy, J. Characterization of Plasmodium liver stage inhibition by halofuginone. *ChemMedChem* **2012**, 7, 844-849.
- (85) Matos, J.; da Cruz, F. P.; Cabrita, É.; Gut, J.; Nogueira, F.; do Rosário, V. E.; Moreira, R.; Rosenthal, P. J.; Prudêncio, M.; Gomes, P. Novel potent metallocenes against liver stage malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, 56, 1564-1570.
- (86) Rosenthal, P. J. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *J. Exp. Biol.* **2003**, 206, 3735-3744.
- (87) Nwaka, S.; Hudson, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 941-955.
- (88) Meister, S.; Plouffe, D. M.; Kuhlen, K. L.; Bonamy, G. M.; Wu, T.; Barnes, S. W.; Bopp, S. E.; Borboa, R.; Bright, A. T.; Che, J. Imaging of Plasmodium liver stages to drive next-generation antimalarial drug discovery. *Science* **2011**, 334, 1372-1377.
- (89) da Cruz, F. P.; Martin, C.; Buchholz, K.; Lafuente-Monasterio, M. J.; Rodrigues, T.; Sönnichsen, B.; Moreira, R.; Gamo, F.-J.; Marti, M.; Mota, M. M. Drug screen targeted at Plasmodium liver stages identifies a potent multistage antimalarial drug. *J. Infect. Dis.* **2012**, 205, 1278-1286.
- (90) Selvam, T.; Kumar, P.; Vijayaraj, P. Quinazoline Marketed drugs—A Review. *Res. in Pharm.* **2011**, 1, 1-21.
- (91) Pati, B.; Banerjee, S. Quinazolines: An Illustrated Review. *J. Adv. Pharm. Educ. Res.* **2013**, 3.
- (92) Wang, D.; Gao, F. Quinazoline derivatives: synthesis and bioactivities. *Chem. Cent. J.* **2013**, 7, 95.
- (93) Madapa, S.; Tusi, Z.; Mishra, A.; Srivastava, K.; Pandey, S.; Tripathi, R.; Puri, S.; Batra, S. Search for new pharmacophores for antimalarial activity. Part II: Synthesis and antimalarial activity of new 6-ureido-4-anilinoquinazolines. *Biorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 222-234.
- (94) Kabri, Y.; Azas, N.; Dumètre, A.; Hutter, S.; Laget, M.; Verhaeghe, P.; Gellis, A.; Vanelle, P. Original quinazoline derivatives displaying antiplasmodial properties. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 616-622.
- (95) Castera-Ducros, C.; Azas, N.; Verhaeghe, P.; Hutter, S.; Garrigue, P.; Dumètre, A.; Mbatchi, L.; Laget, M.; Remusat, V.; Sifredi, F. Targeting the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: In vitro identification of a new antiplasmodial hit in 4-phenoxy-2-trichloromethylquinazoline series. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 4184-4191.
- (96) Zhu, S.; Wang, J.; Chandrashekar, G.; Smith, E.; Liu, X.; Zhang, Y. Synthesis and evaluation of 4-quinazolinone compounds as potential antimalarial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 3864-3869.
- (97) Gemma, S.; Camodeca, C.; Brindisi, M.; Brogi, S.; Kukreja, G.; Kunjir, S.; Gabellieri, E.; Lucantoni, L.; Habluetzel, A.; Taramelli, D. Mimicking the Intramolecular Hydrogen Bond: Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling of Benzoxazines and Quinazolines as Potential Antimalarial Agents. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 10387-10404.

- (98) Tobe, M.; Isobe, Y.; Tomizawa, H.; Nagasaki, T.; Takahashi, H.; Fukazawa, T.; Hayashi, H. Discovery of quinazolines as a novel structural class of potent inhibitors of NF- κ B activation. *Biorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 383-391.
- (99) Willems, L. I.; Van der Linden, W. A.; Li, N.; Li, K.-Y.; Liu, N.; Hoogendoorn, S.; Van der Marel, G. A.; Florea, B. I.; Overkleeft, H. S. Bioorthogonal Chemistry: Applications in Activity-Based Protein Profiling. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 718-729.
- (100) Bertozzi, C. R. A decade of bioorthogonal chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 651-653.
- (101) Baskin, J. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonal click chemistry: Covalent labeling in living systems. *QSAR & Combinatorial Science* **2007**, *26*, 1211-1219.
- (102) Lim, R. K.; Lin, Q. Bioorthogonal chemistry: A covalent strategy for the study of biological systems. *Sci. China Chem.* **2010**, *53*, 61-70.
- (103) Hang, H. C.; Yu, C.; Kato, D. L.; Bertozzi, C. R. A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 14846-14851.
- (104) Hao, Z.; Hong, S.; Chen, X.; Chen, P. R. Introducing Bioorthogonal Functionalities into Proteins in Living Cells. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 742-751.
- (105) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. From mechanism to mouse: a tale of two bioorthogonal reactions. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666-676.
- (106) Lim, R. K.; Lin, Q. Bioorthogonal chemistry: recent progress and future directions. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1589-1600.
- (107) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998.
- (108) Zhang, Z.; Smith, B. A.; Wang, L.; Brock, A.; Cho, C.; Schultz, P. G. A new strategy for the site-specific modification of proteins in vivo. *Biochemistry* **2003**, *42*, 6735-6746.
- (109) Mahal, L. K.; Yarema, K. J.; Bertozzi, C. R. Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis. *Science* **1997**, *276*, 1125-1128.
- (110) Huisgen, R. 1, 3-dipolar cycloadditions. Past and future. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565-598.
- (111) Best, M. D. Click chemistry and bioorthogonal reactions: unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules. *Biochemistry* **2009**, *48*, 6571-6584.
- (112) Debets, M. F.; Van Berkel, S. S.; Dommerholt, J.; Dirks, A. J.; Rutjes, F. P.; Van Delft, F. L. Bioconjugation with strained alkenes and alkynes. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 805-815.
- (113) Song, W.; Wang, Y.; Qu, J.; Madden, M. M.; Lin, Q. A photoinducible 1, 3-dipolar cycloaddition reaction for rapid, selective modification of tetrazole-containing proteins. *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2874-2877.
- (114) Ning, X.; Temming, R. P.; Dommerholt, J.; Guo, J.; Ania, D. B.; Debets, M. F.; Wolfert, M. A.; Boons, G. J.; van Delft, F. L. Protein Modification by Strain-Promoted Alkyne-Nitrone Cycloaddition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3065-3068.
- (115) Carpenter, R. D.; Hausner, S. H.; Sutcliffe, J. L. Copper-free click for PET: Rapid 1, 3-dipolar cycloadditions with a fluorine-18 cyclooctyne. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 885-889.
- (116) Devaraj, N. K.; Weissleder, R. Biomedical applications of tetrazine cycloadditions. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 816-827.
- (117) Knall, A.-C.; Slugovc, C. Inverse electron demand Diels-Alder (iEDDA)-initiated conjugation: a (high) potential click chemistry scheme. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5131-5142.

- (118) Tiefenbrunn, T. K.; Dawson, P. E. Chemoselective ligation techniques: Modern applications of time-honored chemistry. *Peptide Sci.* **2010**, *94*, 95-106.
- (119) Devaraj, N. K.; Upadhyay, R.; Haun, J. B.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R. Fast and sensitive pretargeted labeling of cancer cells through a tetrazine/trans-cyclooctene cycloaddition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7013-7016.
- (120) Devaraj, N. K.; Hilderbrand, S.; Upadhyay, R.; Mazitschek, R.; Weissleder, R. Bioorthogonal Turn-On Probes for Imaging Small Molecules inside Living Cells. *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2931-2934.
- (121) Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. Tetrazine ligation: fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels–Alder reactivity. *JACS* **2008**, *130*, 13518-13519.
- (122) Terai, T.; Nagano, T. Small-molecule fluorophores and fluorescent probes for bioimaging. *Pfluegers Arch./Eur. J. Physiol.* **2013**, 1-13.
- (123) Lakowicz, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3rd Edition ed.; Springer: New York, 2006.
- (124) Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright ideas for chemical biology. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142-155.
- (125) Lapinsky, D. J. Tandem photoaffinity labeling-bioorthogonal conjugation in medicinal chemistry. *Biorg. Med. Chem.* **2012**.
- (126) Kan, T.; Kita, Y.; Morohashi, Y.; Tominari, Y.; Hosoda, S.; Tomita, T.; Natsugari, H.; Iwatsubo, T.; Fukuyama, T. Convenient synthesis of photoaffinity probes and evaluation of their labeling abilities. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2055-2058.
- (127) Vodovozova, E. Photoaffinity labeling and its application in structural biology. *Biochemistry (Mosc.)* **2007**, *72*, 1-20.
- (128) Mawson, A. R. The pathogenesis of malaria: a new perspective. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **2013**, *107*, 122-129.
- (129) Rodrigues, T.; Moreira, R.; Lopes, F. New hope in the fight against malaria? *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 1-3.
- (130) Tobe, M.; Isobe, Y.; Tomizawa, H.; Nagasaki, T.; Takahashi, H.; Hayashi, H. A novel structural class of potent inhibitors of NF- κ B activation: structure–activity relationships and biological effects of 6-aminoquinazoline derivatives. *Biorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3869-3878.
- (131) Rodrigues, T. C. d. O. Novel Mitochondrial Electron Transport-Chain Inhibitors as Potential Antimalarial Agents. PhD, Universidade de Lisboa, 2010.
- (132) Mandal, P. K.; McMurray, J. S. Pd-C-induced catalytic transfer hydrogenation with triethylsilane. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6599-6601.
- (133) Fotsch, C.; Sonnenberg, J. D.; Chen, N.; Hale, C.; Karbon, W.; Norman, M. H. Synthesis and structure-activity relationships of trisubstituted phenyl urea derivatives as neuropeptide Y5 receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2344-2356.
- (134) Evans, D. A.; Katz, J. L.; West, T. R. Synthesis of diaryl ethers through the copper-promoted arylation of phenols with arylboronic acids. An expedient synthesis of thyroxine. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2937-2940.
- (135) Hore, P.; Compton, R.: *Nuclear Magnetic Resonance: Oxford Chemistry Primers*; Oxford University Press, New York, **1995**.
- (136) Bain, A. D. Chemical exchange in NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2003**, *43*, 63-103.
- (137) Silverstein, R.; Webster, F.: *Spectrometric identification of organic compounds*; Wiley. com, **2006**.

- (138) Sirisoma, N.; Pervin, A.; Zhang, H.; Jiang, S.; Willardsen, J. A.; Anderson, M. B.; Mather, G.; Pleiman, C. M.; Kasibhatla, S.; Tseng, B. Discovery of *N*-(4-methoxyphenyl)-*N*, 2-dimethylquinazolin-4-amine, a potent apoptosis inducer and efficacious anticancer agent with high blood brain barrier penetration. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2341-2351.
- (139) Kabri, Y.; Verhaeghe, P.; Gellis, A.; Vanelle, P. Regioselective Suzuki-Miyaura reaction: application to the microwave-promoted synthesis of 4, 7-diarylquinazolines. *Molecules* **2010**, *15*, 2949-2961.
- (140) Rebelo, M.; Sousa, C.; Shapiro, H. M.; Mota, M. M.; Grobusch, M. P.; Hänscheid, T. A Novel Flow Cytometric Hemozoin Detection Assay for Real-Time Sensitivity Testing of *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* **2013**, *8*, e61606.
- (141) Ploemen, I. H.; Prudêncio, M.; Douradinha, B. G.; Ramesar, J.; Fonager, J.; van Gemert, G.-J.; Luty, A. J.; Hermesen, C. C.; Sauerwein, R. W.; Baptista, F. G. Visualisation and quantitative analysis of the rodent malaria liver stage by real time imaging. *PLoS One* **2009**, *4*, e7881.
- (142) Kumar, S. P.; Glória, P. M.; Gonçalves, L. M.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Moreira, R.; Santos, M. M. Squaric acid: a valuable scaffold for developing antimalarials? *MedChemComm* **2012**, *3*, 489-493.
- (143) Thomas, D.; Wimmer, A.-B.; Wu, K.; Hammerling, B. C.; Ficker, E. K.; Kuryshchev, Y. A.; Kiehn, J.; Katus, H. A.; Schoels, W.; Karle, C. A. Inhibition of human ether-a-go-go-related gene potassium channels by α 1-adrenoceptor antagonists prazosin, doxazosin, and terazosin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2004**, *369*, 462-472.
- (144) Blum, C. A.; Zheng, X.; Brielmann, H.; Hodgetts, K. J.; Bakthavatchalam, R.; Chandrasekhar, J.; Krause, J. E.; Cortright, D.; Matson, D.; Crandall, M. Aminoquinazolines as TRPV1 antagonists: modulation of drug-like properties through the exploration of 2-position substitution. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4573-4577.
- (145) Leeson, P. Drug discovery: Chemical beauty contest. *Nature* **2012**, *481*, 455-456.
- (146) Gießler, K.; Griesser, H.; Göhringer, D.; Sabirov, T.; Richert, C. Synthesis of 3'-BODIPY-Labeled Active Esters of Nucleotides and a Chemical Primer Extension Assay on Beads. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 3611-3620.
- (147) McNab, H.; Thornley, C. Chemistry of pyrrolizinones. Part 1. Reactions of pyrrolizin-3-ones with electrophiles: synthesis of 3, 8-didehydroheliotridin-5-one1. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 3584-3591.
- (148) Antina, E.; Guseva, G.; Loginova, A.; Semeikin, A.; V'yugin, A. Synthesis and spectral properties of new 3, 3'-bis (dipyrrolylmethene) with acetylene spacer. *Russ. J. Gen. Chem.* **2010**, *80*, 2374-2381.
- (149) Carlson, J. C.; Meimetis, L. G.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R. BODIPY-Tetrazine Derivatives as Superbright Bioorthogonal Turn-on Probes. *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 7055-7058.
- (150) Lang, K.; Davis, L.; Wallace, S.; Mahesh, M.; Cox, D. J.; Blackman, M. L.; Fox, J. M.; Chin, J. W. Genetic encoding of bicyclononynes and trans-cyclooctenes for site-specific protein labeling in vitro and in live mammalian cells via rapid fluorogenic Diels-Alder reactions. *JACS* **2012**, *134*, 10317-10320.
- (151) Yang, J.; Karver, M. R.; Li, W.; Sahu, S.; Devaraj, N. K. Metal-Catalyzed One-Pot Synthesis of Tetrazines Directly from Aliphatic Nitriles and Hydrazine. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 5312-5315.
- (152) Hillmyer, M. A.; Laredo, W. R.; Grubbs, R. H. Ring-opening metathesis polymerization of functionalized cyclooctenes by a ruthenium-based metathesis catalyst. *Macromolecules* **1995**, *28*, 6311-6316.
- (153) Royzen, M.; Yap, G. P.; Fox, J. M. A photochemical synthesis of functionalized trans-cyclooctenes driven by metal complexation. *JACS* **2008**, *130*, 3760-3761.

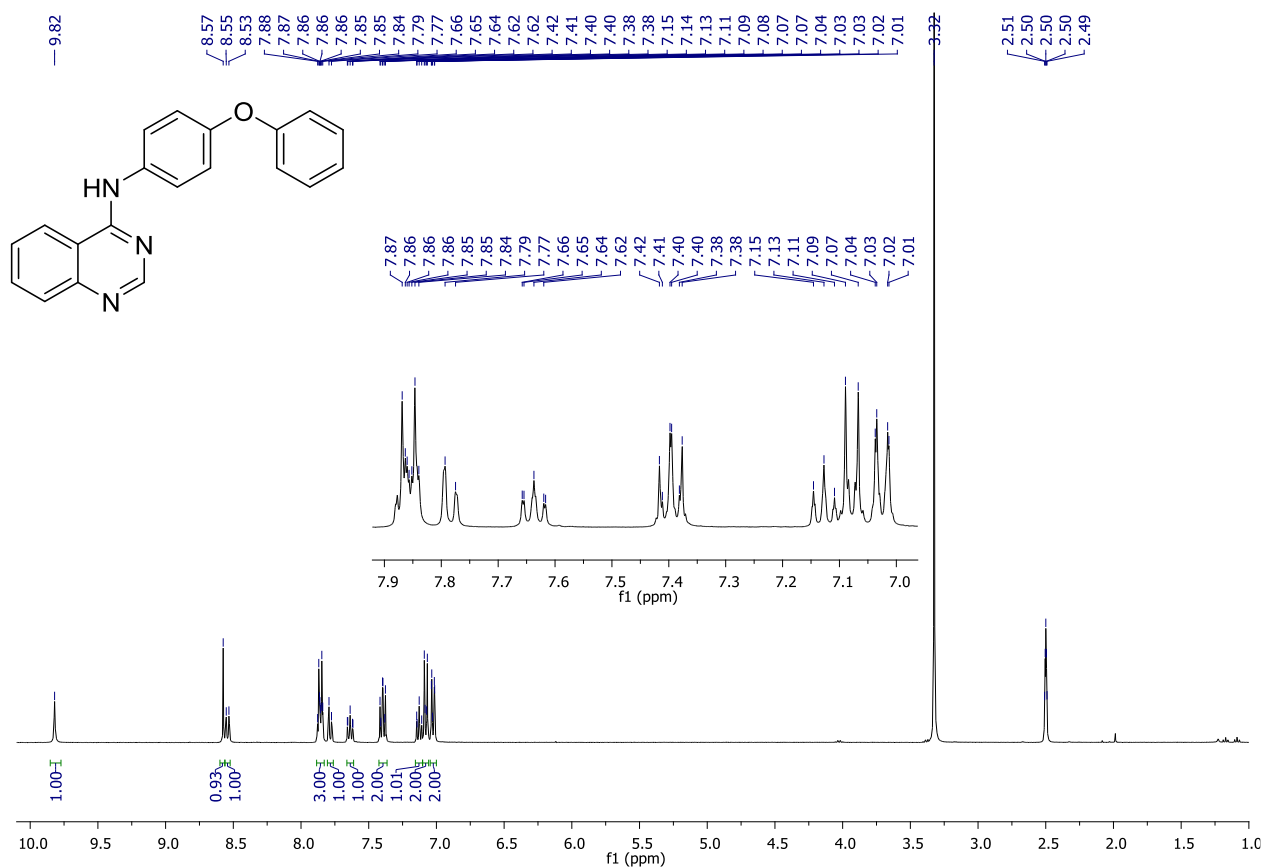
- (154) YAMADA, S.; MAEDA, H.; HORI, Y.: CATALYST FOR ASYMMETRIC HYDROGENATION AND METHOD FOR MANUFACTURING OPTICALLY ACTIVE CARBONYL COMPOUND USING THE SAME. WO Patent 2,012,074,128, 2012.
- (155) Nakatani, K.; Yoshida, T.; Saito, I. Photochemistry of benzophenone immobilized in a major groove of DNA: formation of thermally reversible interstrand cross-link. *JACS* **2002**, *124*, 2118-2119.
- (156) Wipf, P.; Venkatraman, S. An improved protocol for azole synthesis with PEG-supported Burgess reagent. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4659-4662.
- (157) Zhang, Q.; Wang, D.; Wang, X.; Ding, K. (2-Pyridyl) acetone-Promoted Cu-Catalyzed O-Arylation of Phenols with Aryl Iodides, Bromides, and Chlorides. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7187-7190.
- (158) Maiti, D.; Buchwald, S. L. Orthogonal Cu- and Pd-based catalyst systems for the O- and N-arylation of aminophenols. *JACS* **2009**, *131*, 17423-17429.
- (159) Islam, M.; Mondal, S.; Mondal, P.; Roy, A. S.; Hossain, D.; Mobarak, M. Open air O-arylation reaction of phenols with aryl halides catalyzed by polymer-anchored copper (II) complexes. *Transition Met. Chem.* **2011**, *36*, 1-11.
- (160) Mourer, M.; Dibama, H. M.; Fontanay, S.; Grare, M.; Duval, R. E.; Finance, C.; Regnouf-de-Vains, J.-B. *p*-Guanidinoethyl calixarene and parent phenol derivatives exhibiting antibacterial activities. Synthesis and biological evaluation. *Biorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5496-5509.
- (161) Hart, M. E.; Suchland, K. L.; Miyakawa, M.; Bunzow, J. R.; Grandy, D. K.; Scanlan, T. S. Trace amine-associated receptor agonists: synthesis and evaluation of thyronamines and related analogues. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1101-1112.
- (162) Ma, X.-Y.; He, Y.; Hu, Y.-L.; Lu, M. Copper (II)-catalyzed hydration of nitriles with the aid of acetaldoxime. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 449-452.
- (163) Zhao, H.; Fu, H.; Qiao, R. Copper-catalyzed direct amination of ortho-functionalized haloarenes with sodium azide as the amino source. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3311-3316.
- (164) CHAMBERLAIN, S.; DEANDA Jr, F.; GERDING, R.; HASEGAWA, M.; KUNTZ, K.; SHOTWELL, J.; WILSON, J.; LEI, H.; MIYAZAKI, Y.; NISHIGAKI, N.: 2-[(2-{Phenylamino}-1H-pyrrolo [2, 3-d] pyrimidin-4-yl) amino] benzamide derivatives as IGF-1r inhibitors for the treatment of cancer. WO Patent 2,009,020,990, 2009.
- (165) Yale, H. L.; Kalkstein, M. Substituted 2, 3-dihydro-4 (1H)-quinazolinones. A new class of inhibitors of cell multiplication. *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 334-336.
- (166) Kanişkan, N.; Kökten, Ş.; Çelik, İ. A new protocol for the synthesis of primary, secondary and tertiary anthranilamides utilizing N-(2-aminoarylacyl) benzotriazoles. *ARKIVOC* **2012**, *8*, 198-213.
- (167) ABRAHAM, S.; CHAO, Q.; HADD, M.; HOLLADAY, M.; LIU, G.; SETTI, E.: JAK KINASE MODULATING QUINAZOLINE DERIVATIVES AND METHODS OF USE THEREOF. WO Patent 2,010,099,379, 2010.
- (168) Ma, X.; He, Y.; Wang, P.; Lu, M. The hydration of nitriles catalyzed by simple transition metal salt of the fourth period with the aid of acetaldoxime. *Appl. Organomet. Chem.* **2012**, *26*, 377.
- (169) Orfi, L.; Wączek, F.; Pató, J.; Varga, I.; Hegymegi-Barakonyi, B.; Houghten, R. A.; Ker, G. Improved, high yield synthesis of 3H-quinazolin-4-ones, the key intermediates of recently developed drugs. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2549-2553.
- (170) LeMahieu, R. A.; Carson, M.; Nason, W. C.; Parrish, D. R.; Welton, A. F.; Baruth, H. W.; Yaremko, B. (E)-3-(4-oxo-4H-quinazolin-3-yl)-2-propenoic acids, a new series of antiallergy agents. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 420-425.

- (171) Alexandre, F.-R.; Berecibar, A.; Wrigglesworth, R.; Besson, T. Novel series of 8*H*-quinazolino [4, 3-*b*] quinazolin-8-ones via two Niementowski condensations. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 1413-1419.
- (172) CAI, X.; QIAN, C.; GOULD, S.; ZHAI, H.: MULTI-FUNCTIONAL SMALL MOLECULES AS ANTI-PROLIFERATIVE AGENTS. WO Patent 2,008,033,747, 2008.
- (173) AQUILA, B.; EZHUTHACHAN, J.; LYNE, P.; PONTZ, T.; ZHENG, X.: QUINAZOLINE DERIVATIVES, PROCESS FOR THEIR PREPARATION AND THEIR USE AS ANTI-CANCER AGENTS. WO Patent 2,007,071,963, 2007.
- (174) Wang, D.; Fan, J.; Gao, X.; Wang, B.; Sun, S.; Peng, X. Carboxyl BODIPY dyes from bicarboxylic anhydrides: one-pot preparation, spectral properties, photostability, and biolabeling. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7675-7683.
- (175) Ballini, R.; Petrini, M. Base assisted substitution of α -amidoalkyl sulfones by nitromethane anion. A new entry to functionalized α -amino acids. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4449-4452.

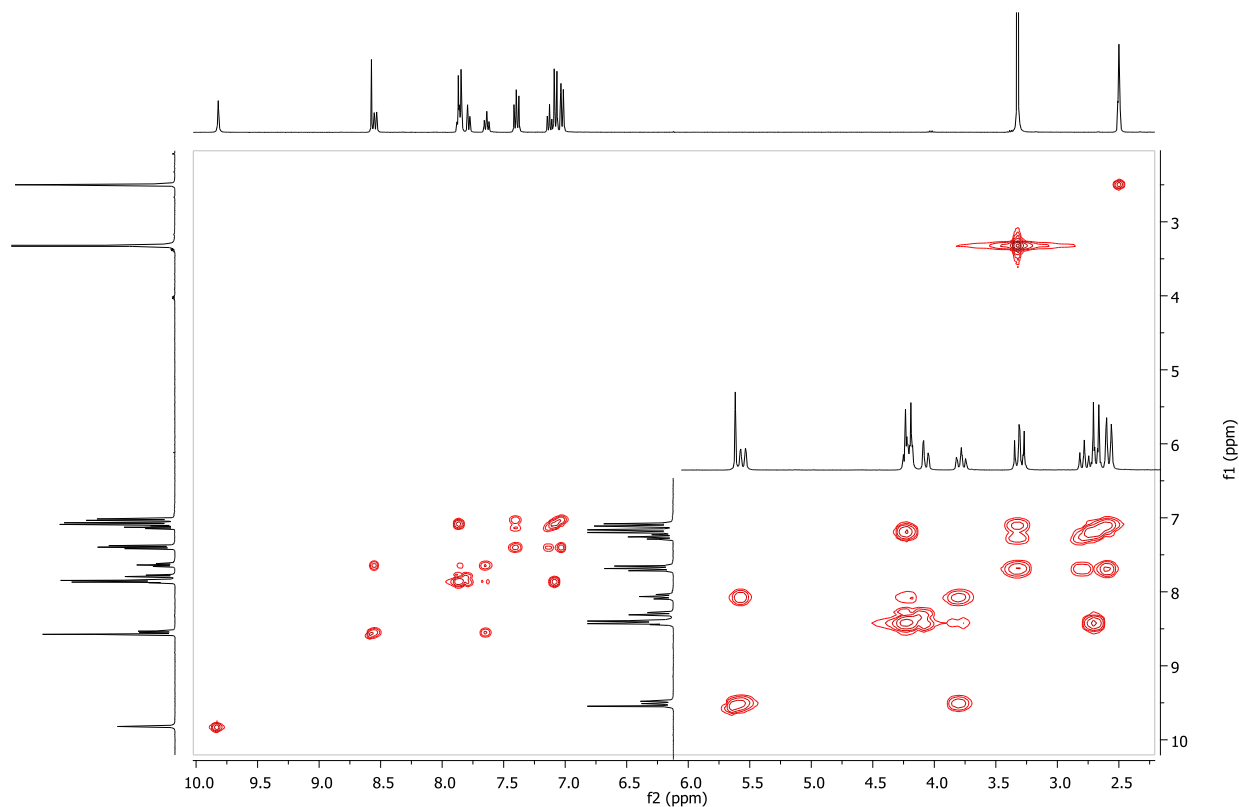
Capítulo 8

Anexos

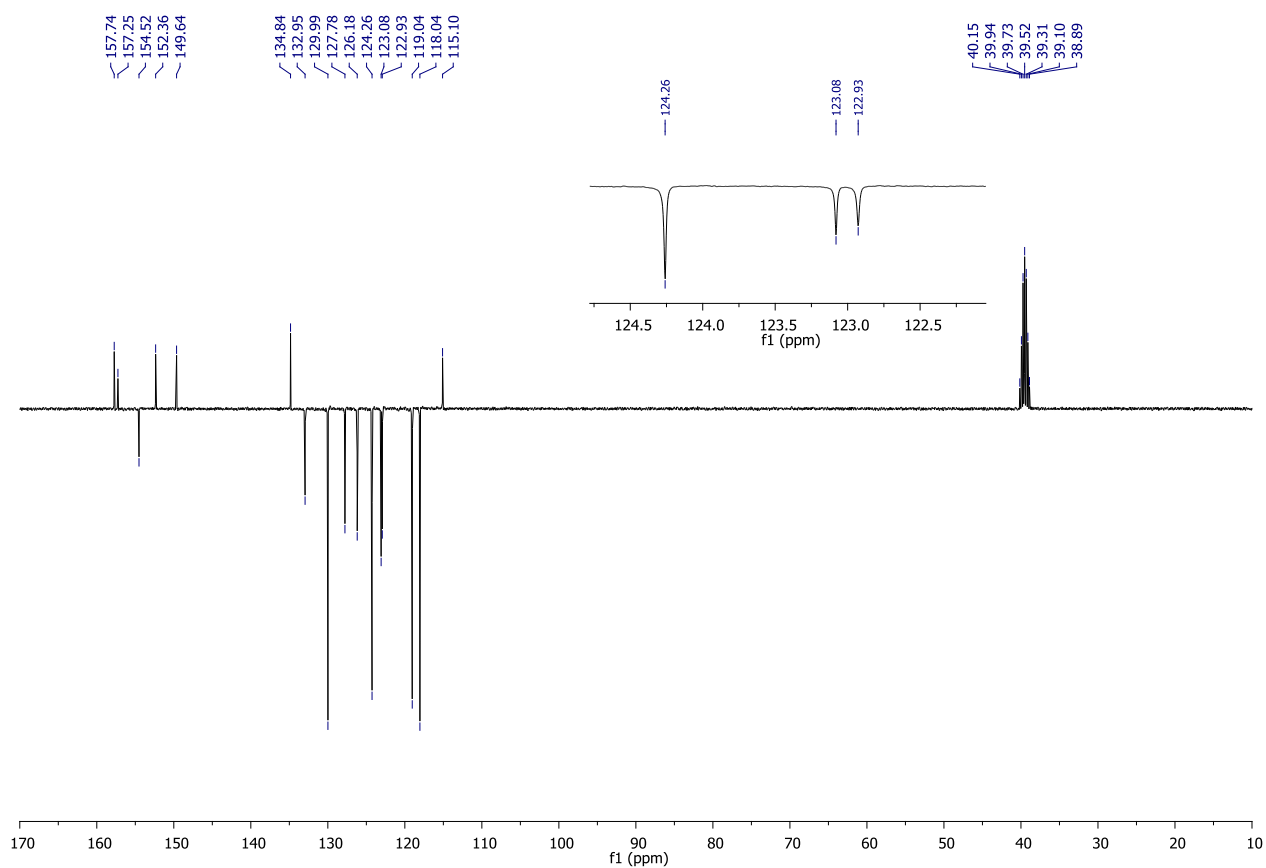
Espectro ^1H -RMN da *N*-(4-fenoxifenil)quinazolin-4-amina (123)



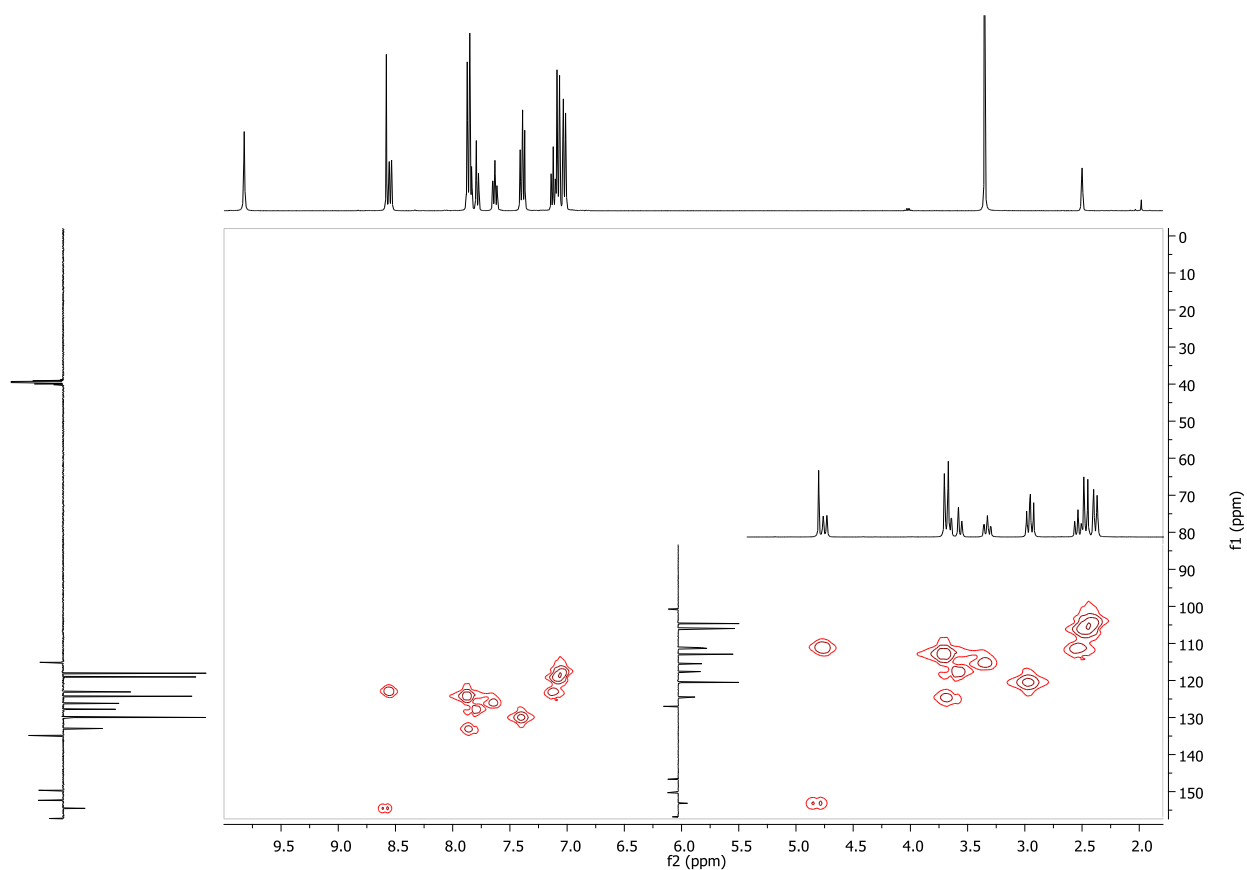
Espectro bidimensional COSY da *N*-(4-fenoxifenil)quinazolin-4-amina (123)



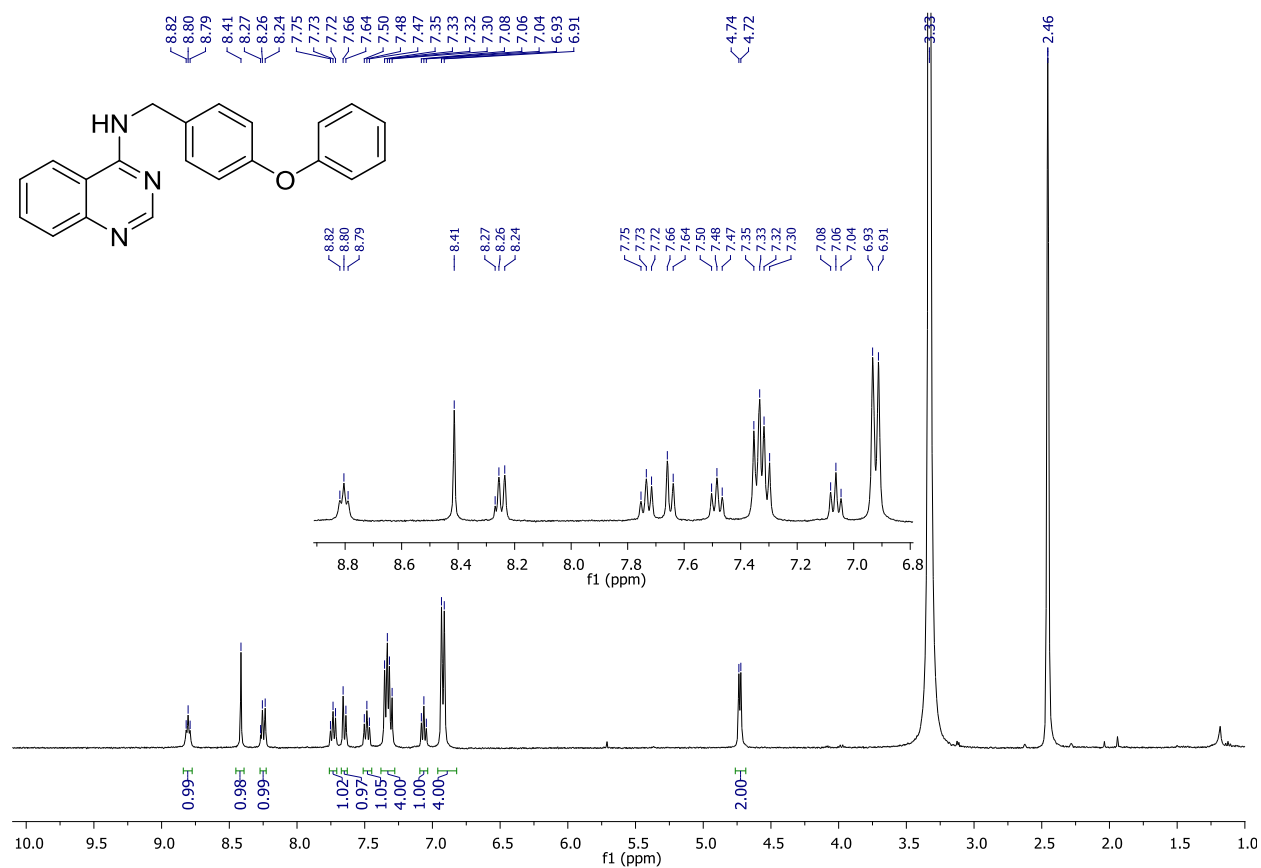
Espectro de ^{13}C -RMN da *N*-(4-fenoxifenil)quinazolin-4-amina (123)



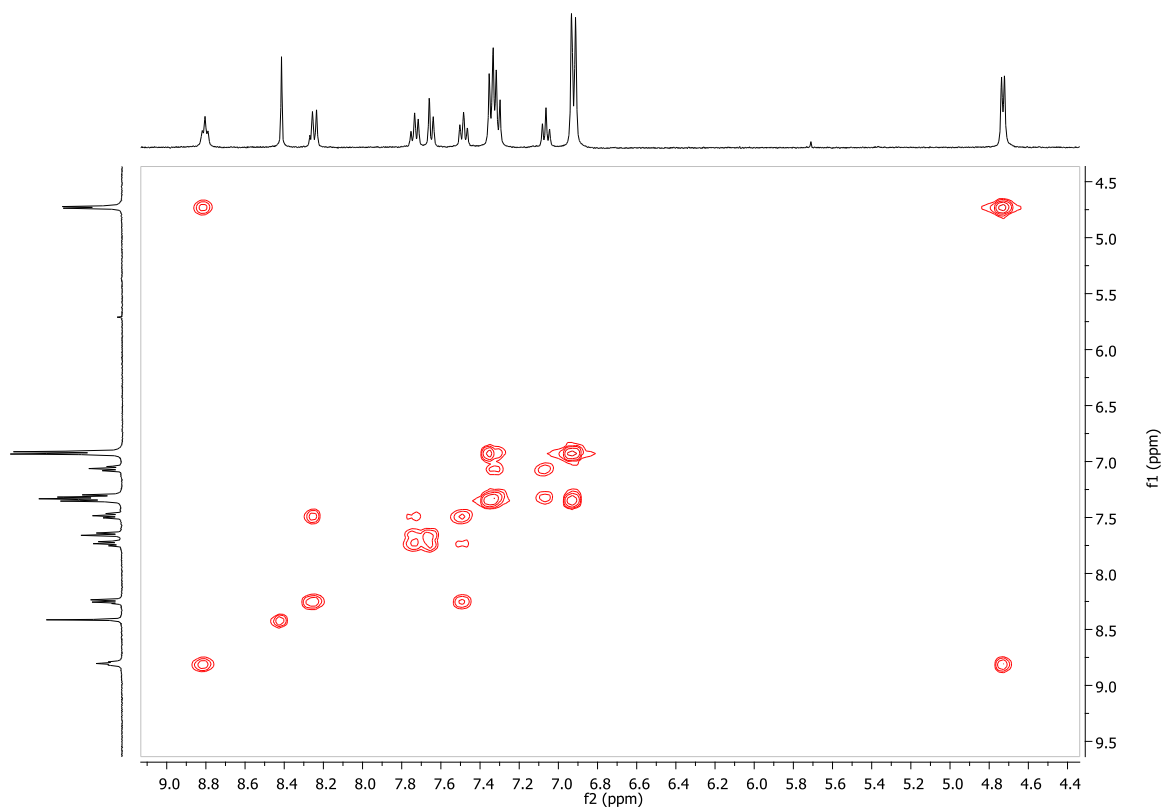
Espectro bidimensional HMQC da *N*-(4-fenoxifenil)quinazolin-4-amina (123)



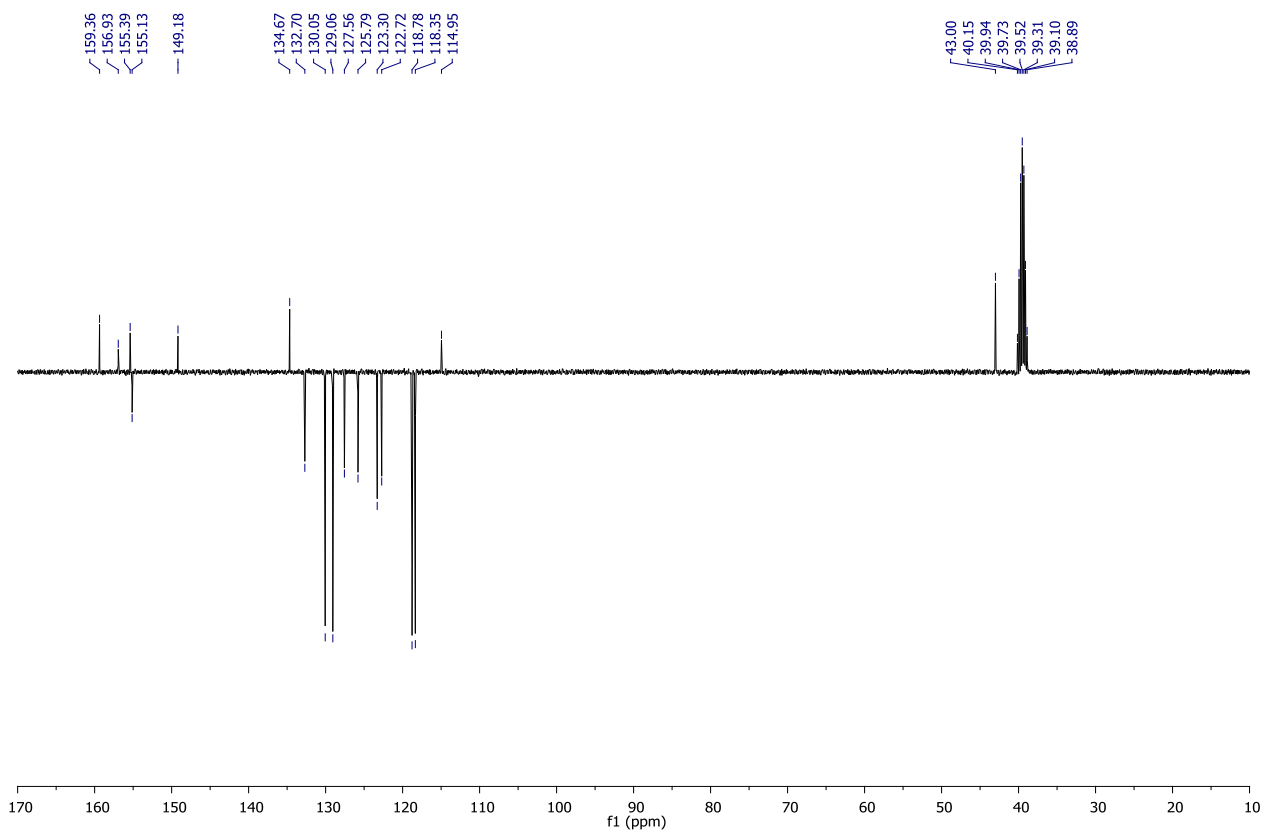
Espectro ^1H -RMN da *N*-(4-fenoxibenzil)quinazolin-4-amina (124)



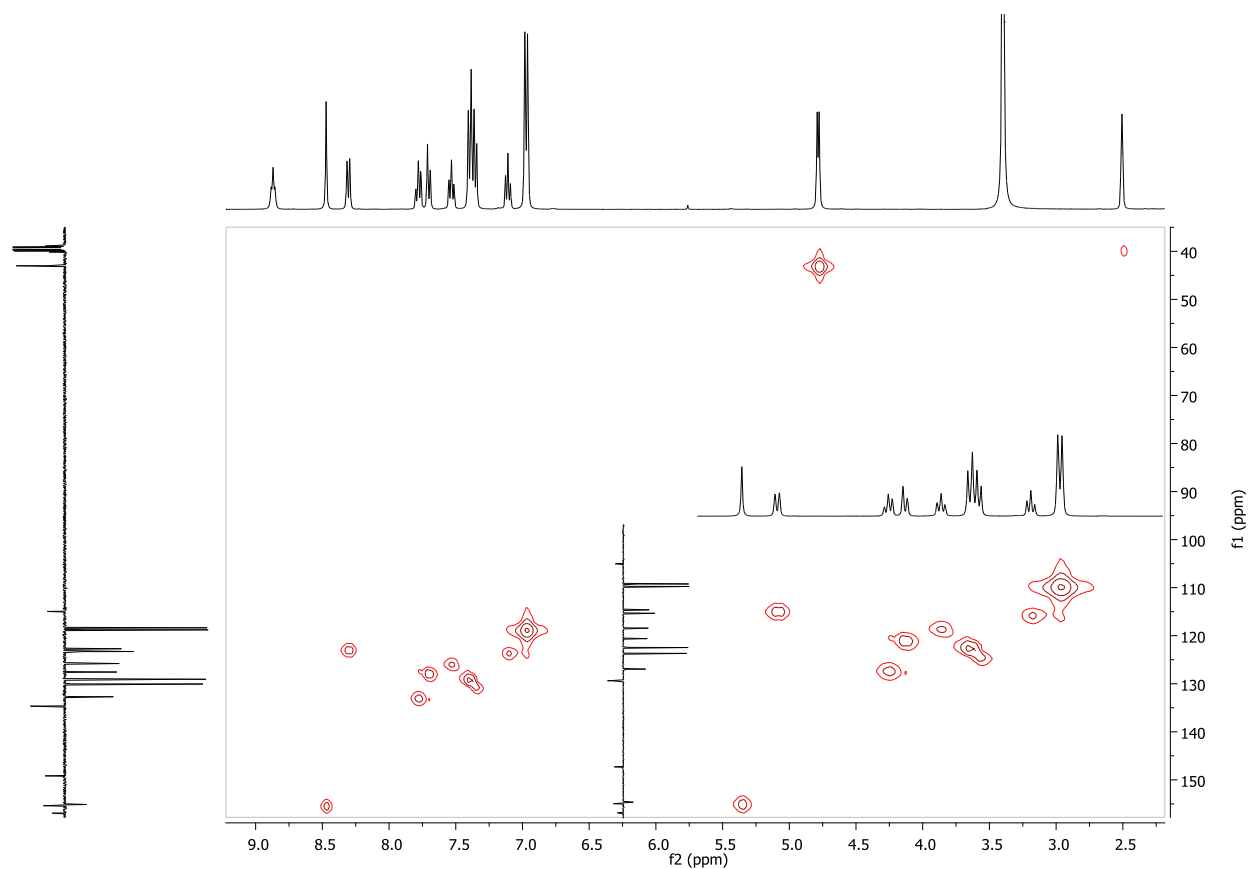
Espectro bidimensional COSY da *N*-(4-fenoxibenzil)quinazolin-4-amina (124)



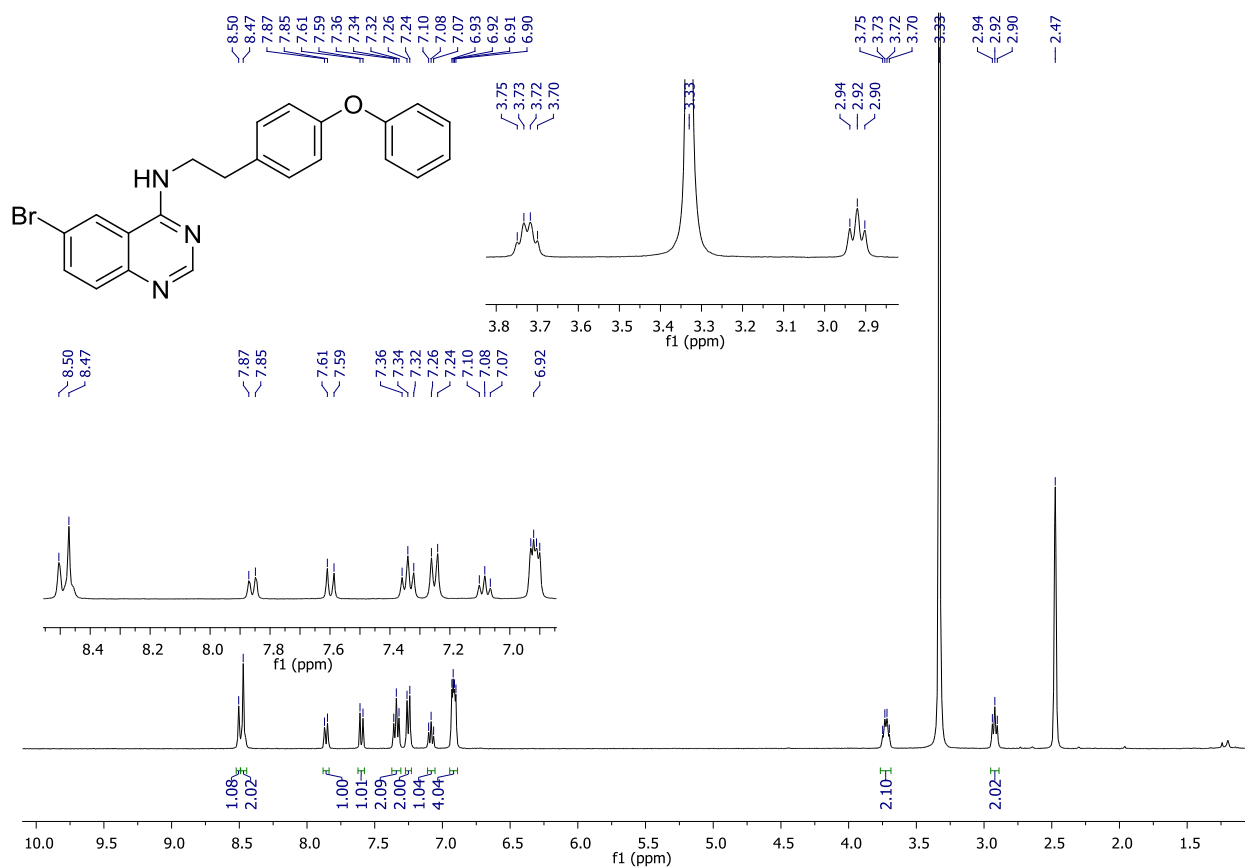
Espectro ^{13}C -RMN da *N*-(4-fenoxibenzil)quinazolin-4-amina (124)



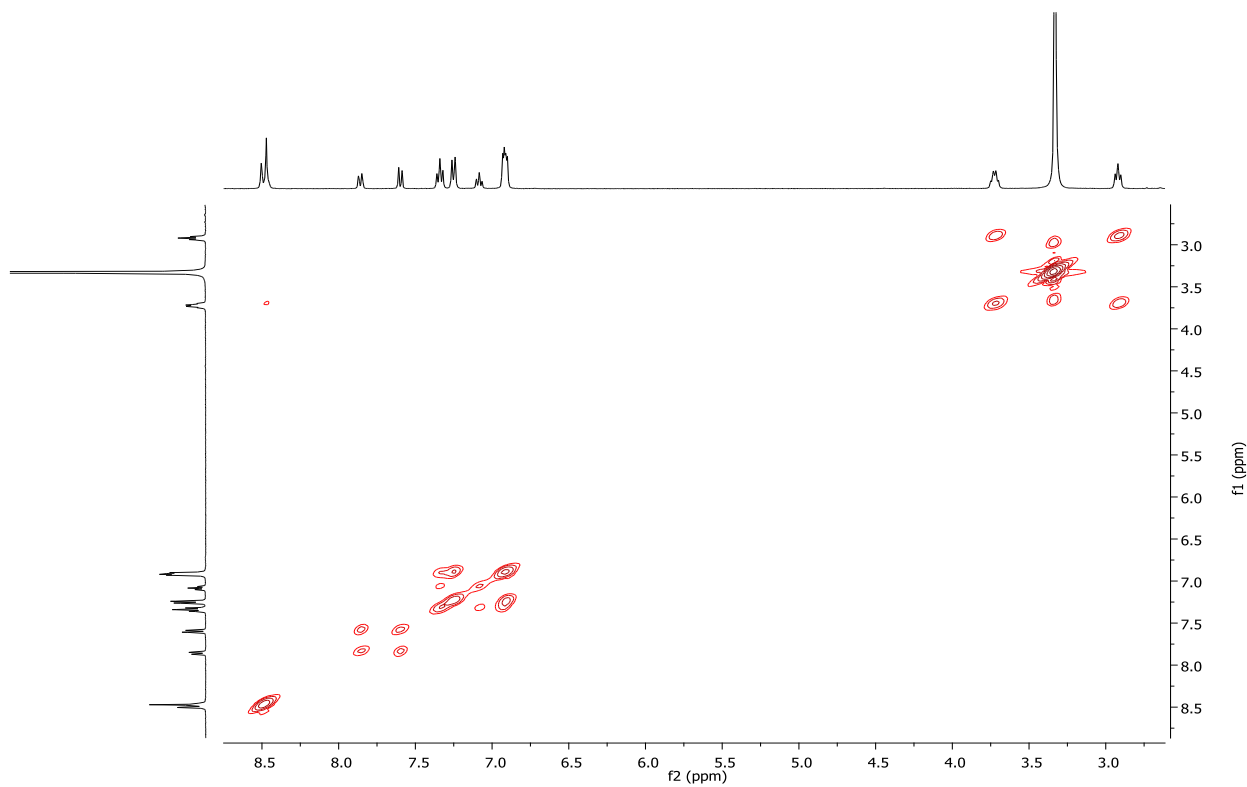
Espectro bidimensional HMQC da *N*-(4-fenoxibenzil)quinazolin-4-amina (124)



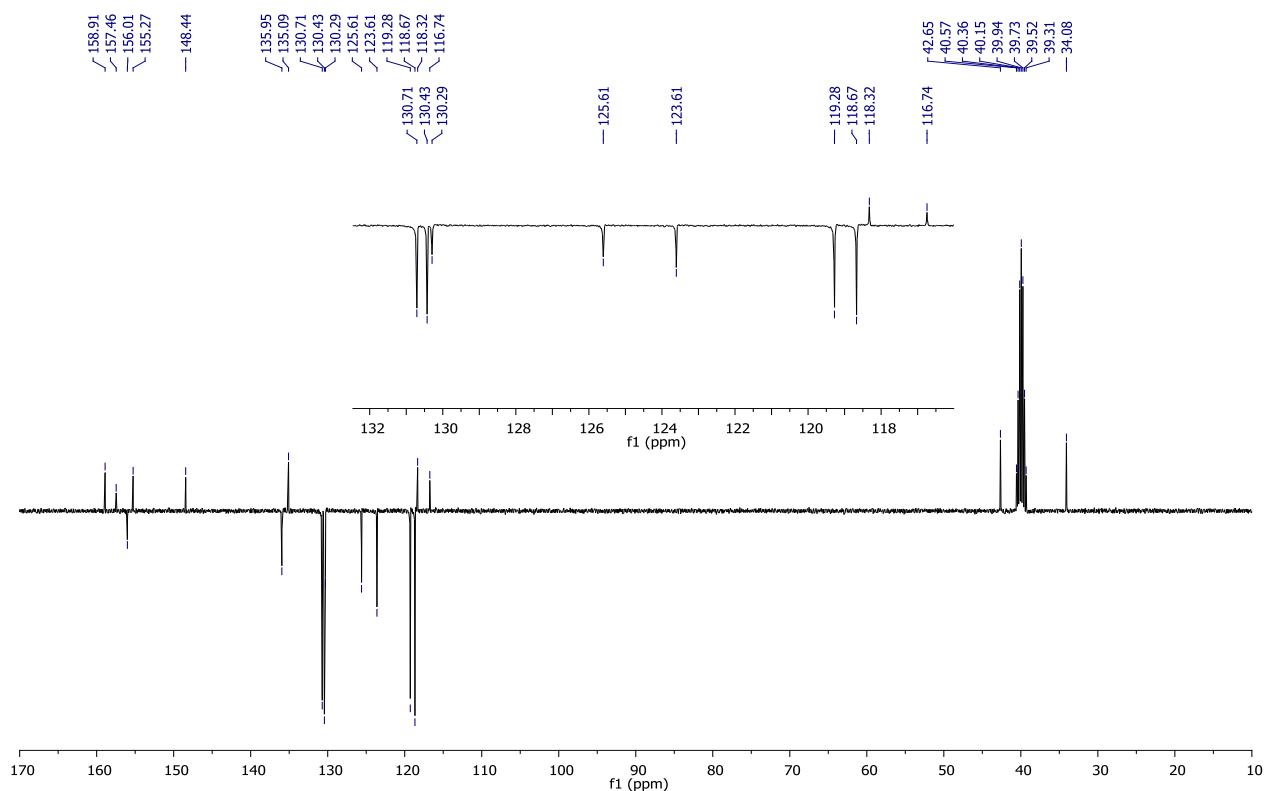
Espectro ^1H -RMN da 6-Bromo-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (125)



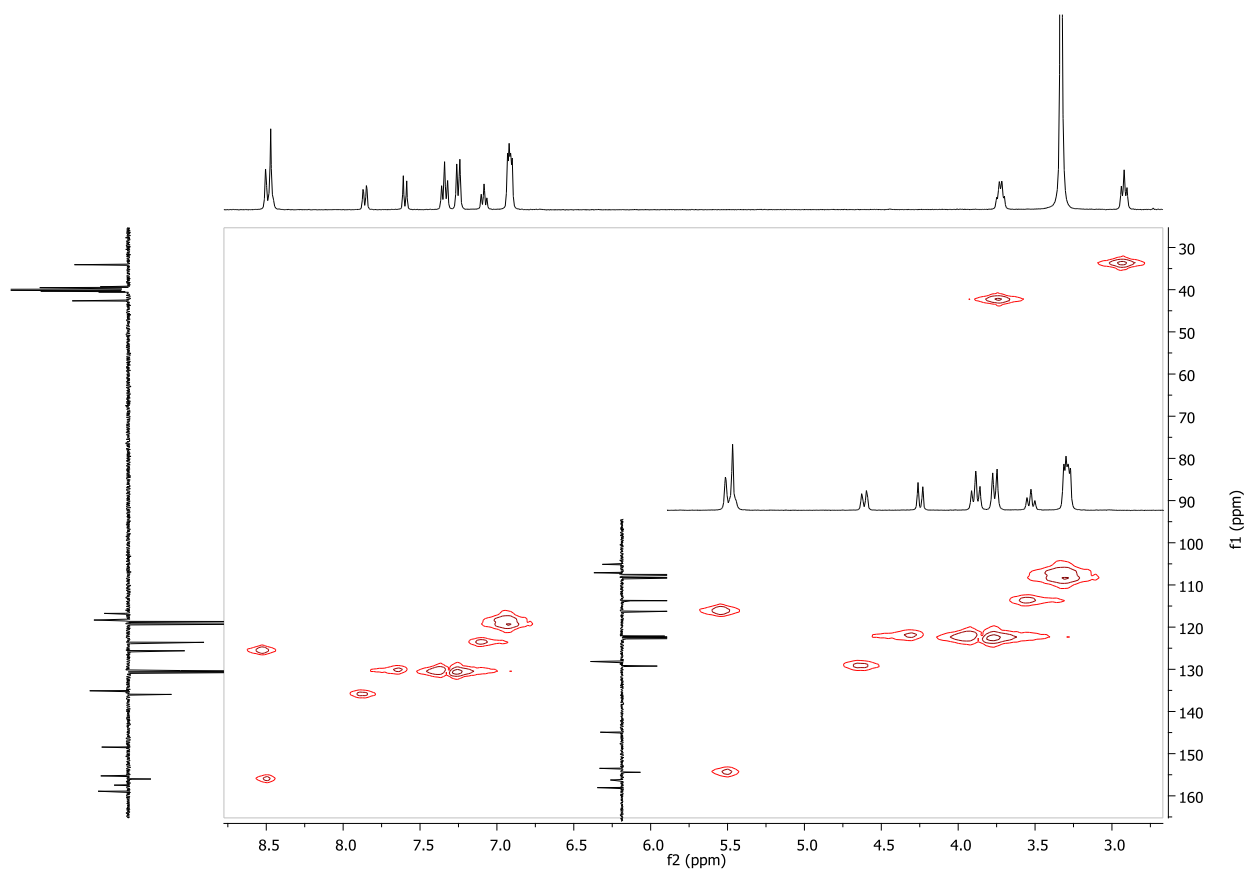
Espectro bidimensional COSY da 6-Bromo-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (125)



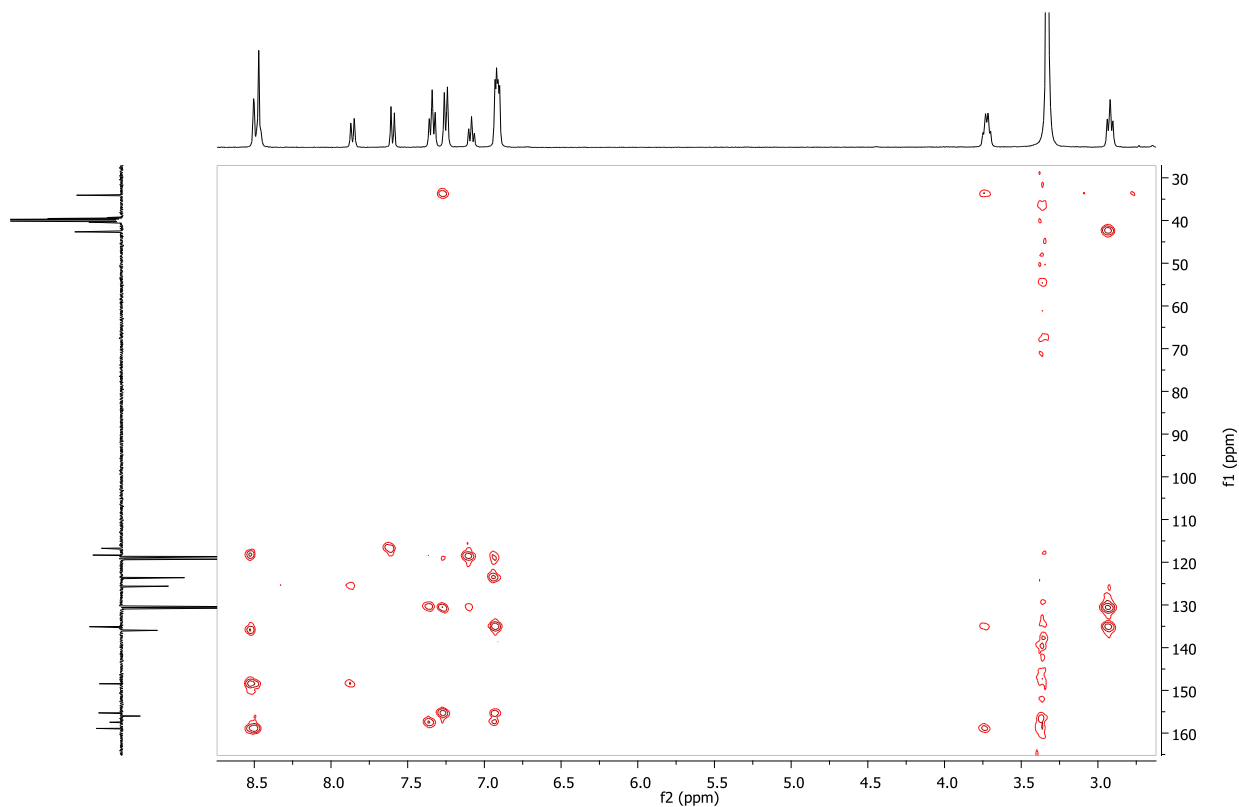
Espectro ^{13}C -RMN da 6-Bromo-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (125)



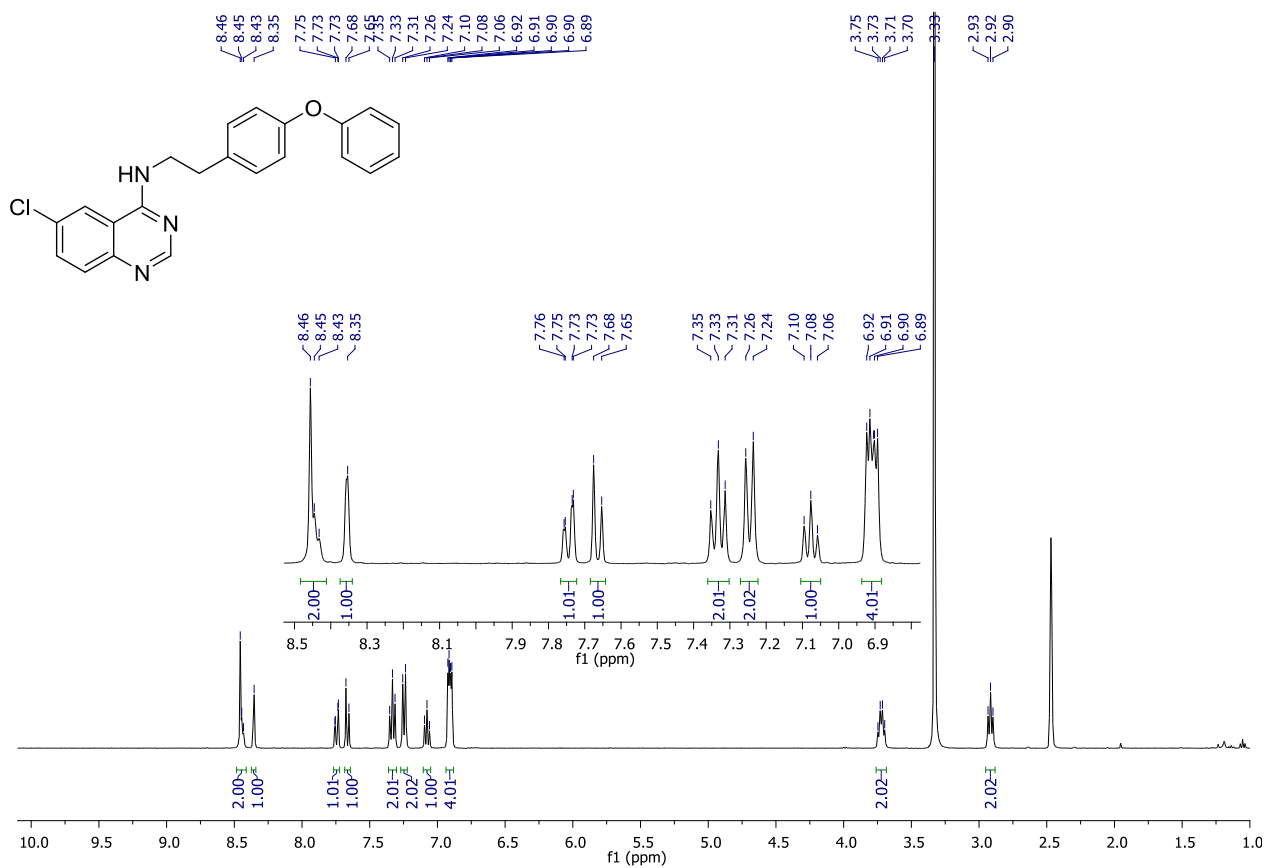
Espectro bidimensional HMQC da 6-Bromo-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (125)



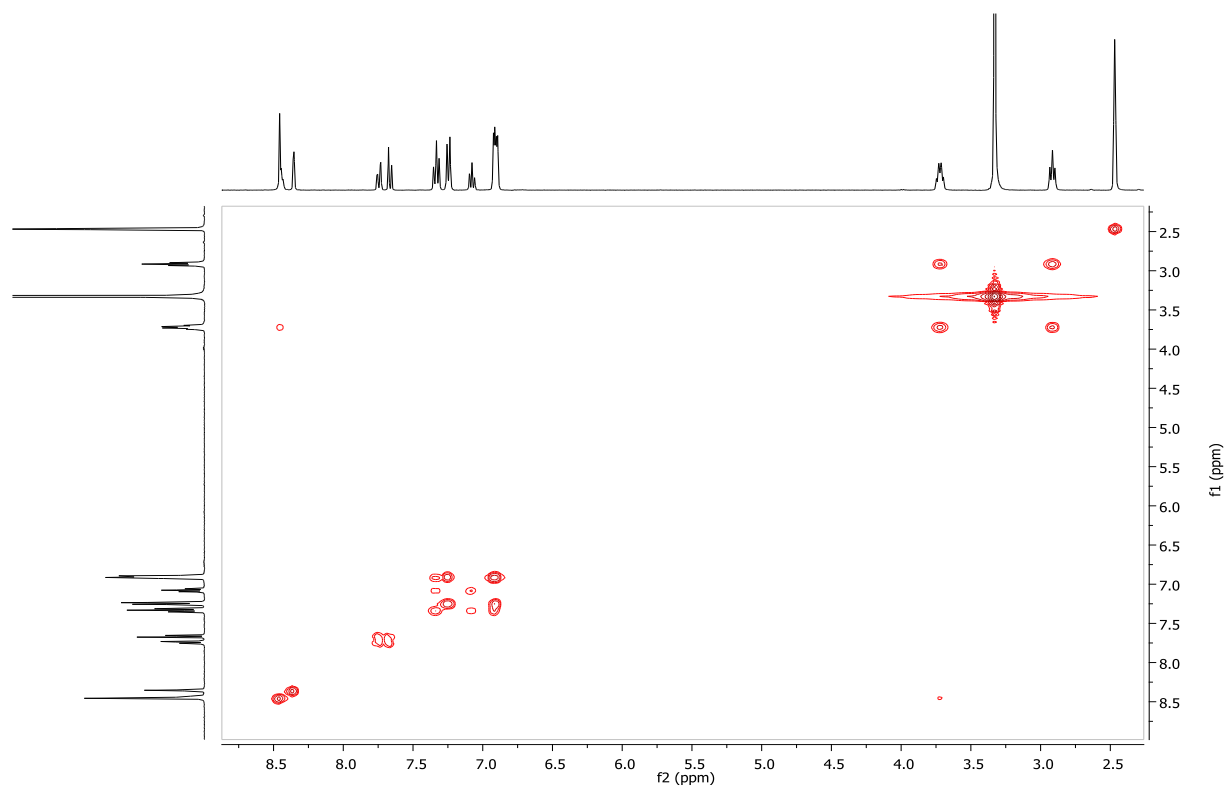
Espectro bidimensional HMBC da 6-Bromo-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (125)



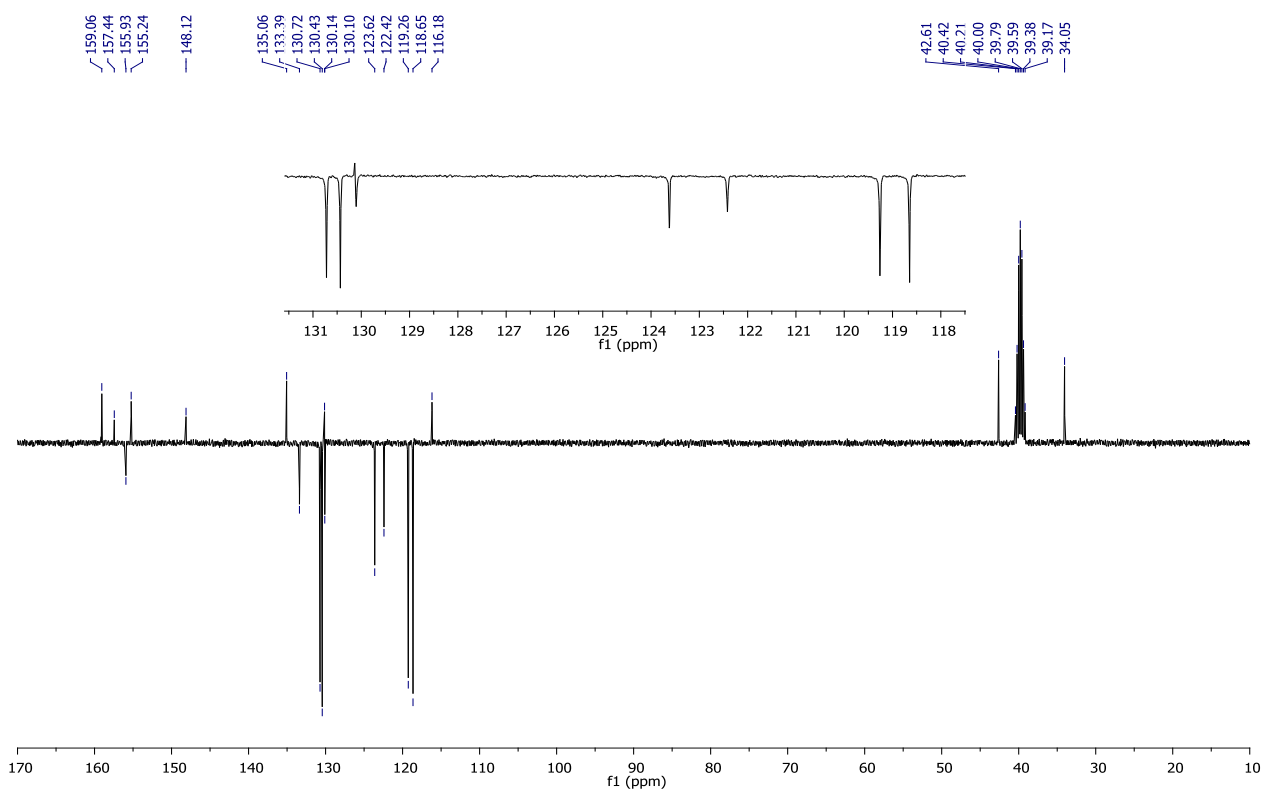
Espectro ^1H -RMN da 6-Cloro-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (126)



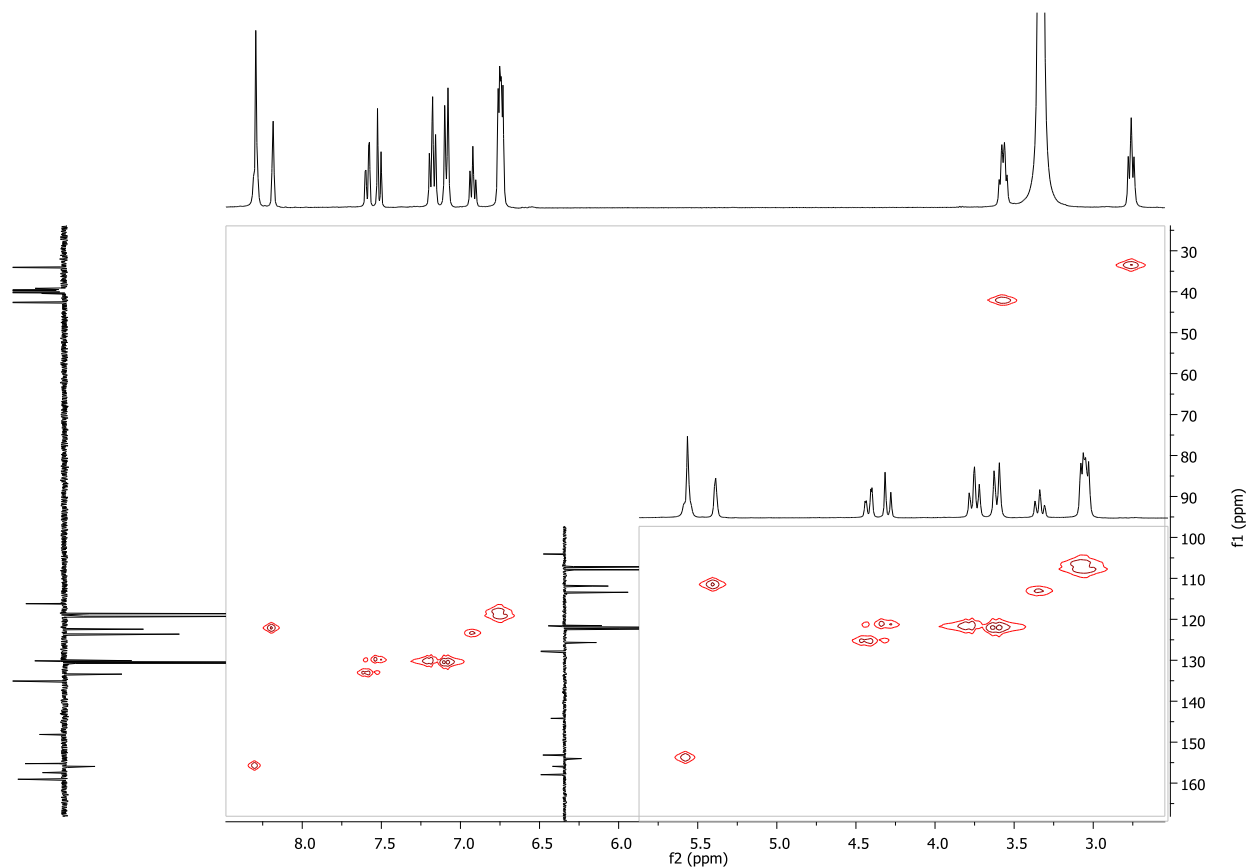
Espectro bidimensional COSY da 6-Cloro-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (126)



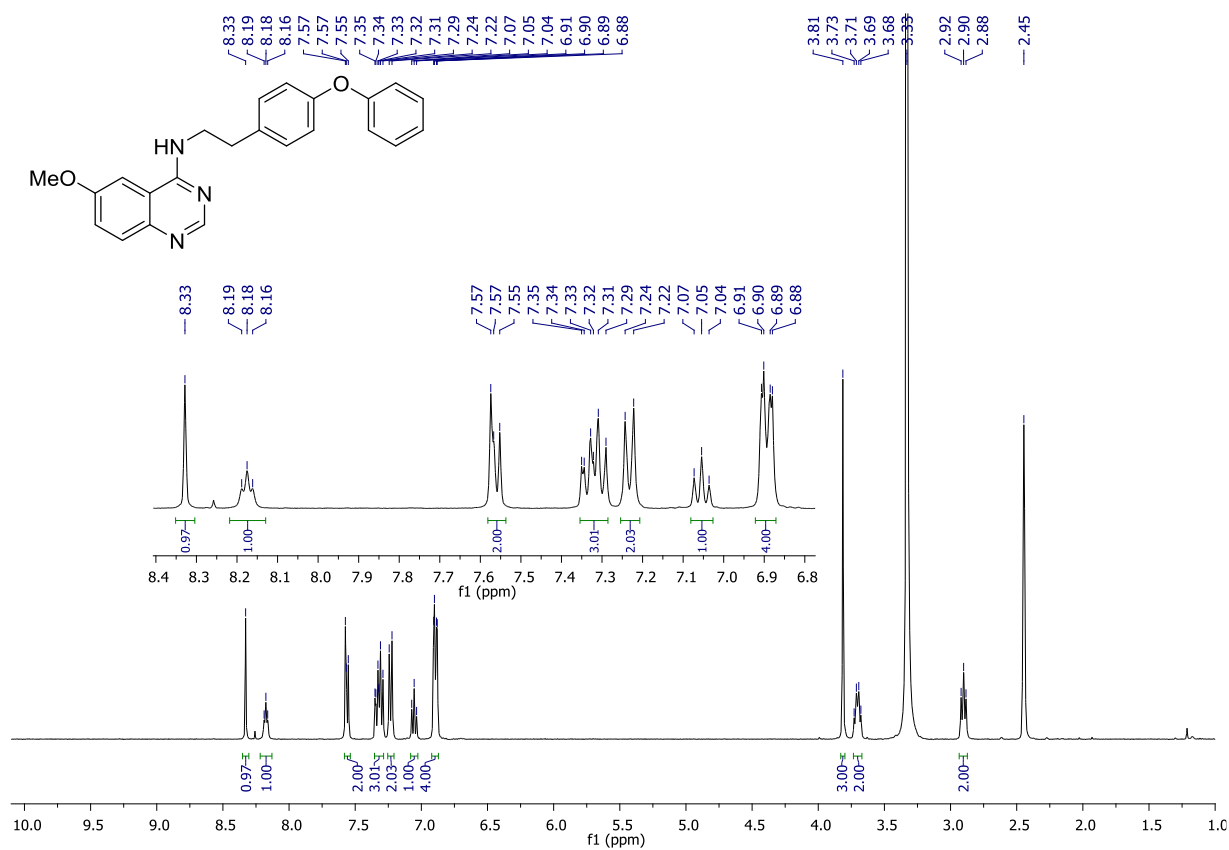
Espectro ^{13}C -RMN da 6-Cloro-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (126)



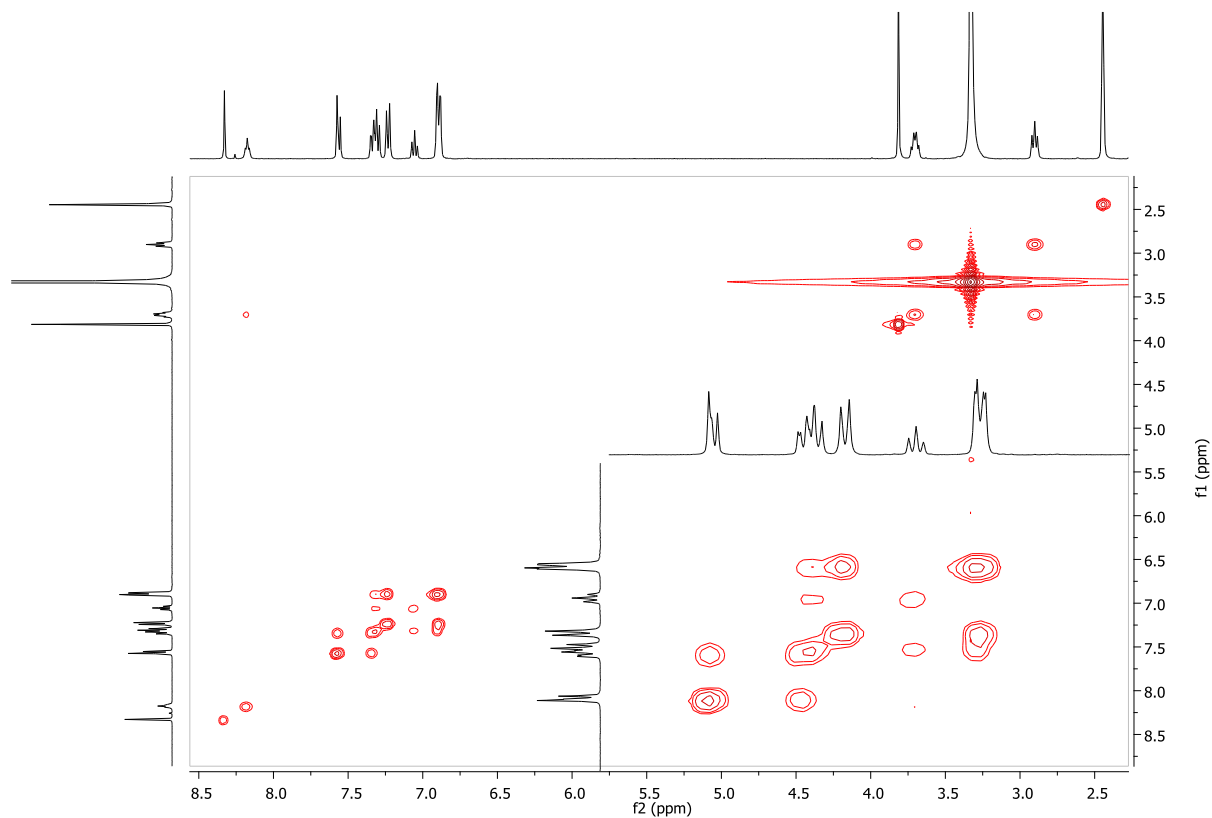
Espectro bidimensional HMQC da 6-Cloro-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (126)



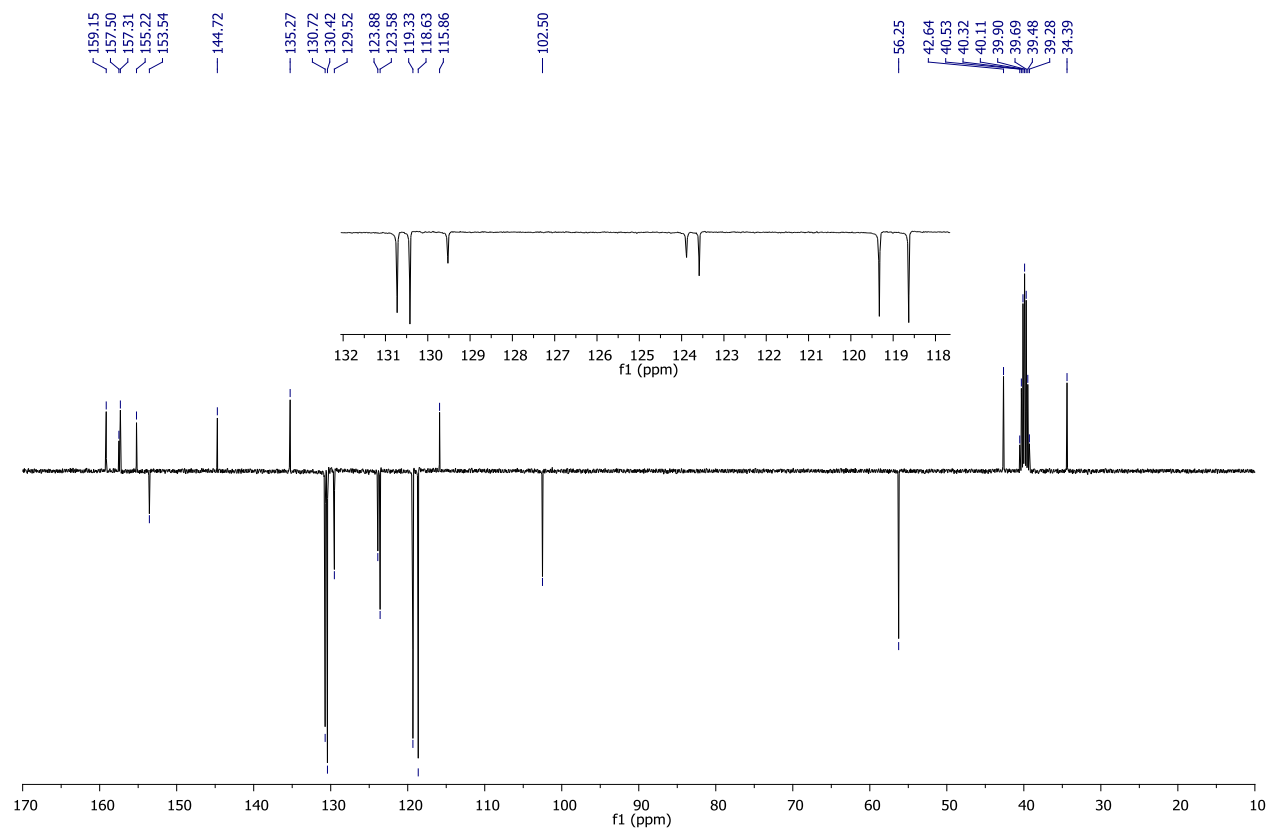
Espectro ^1H -RMN da 6-Metoxi-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (127)



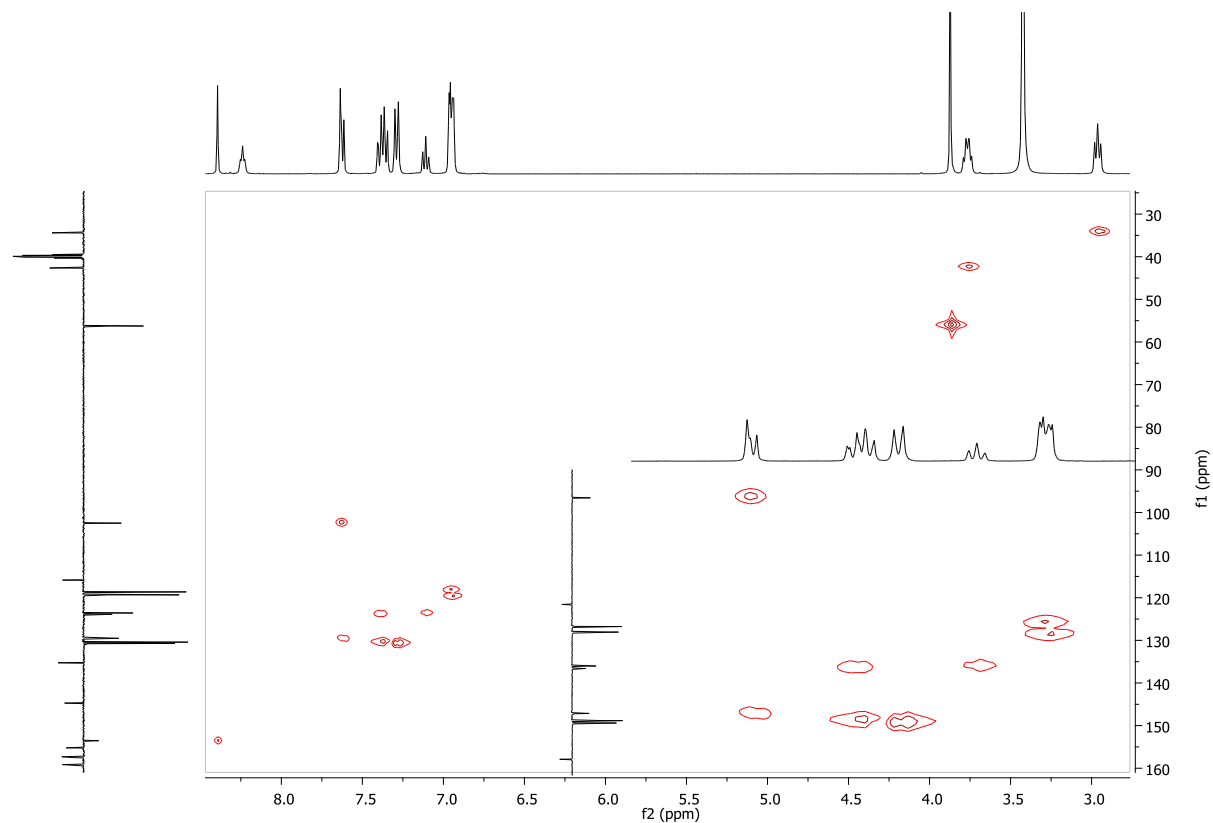
Espectro bidimensional COSY da 6-Metoxi-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (127)



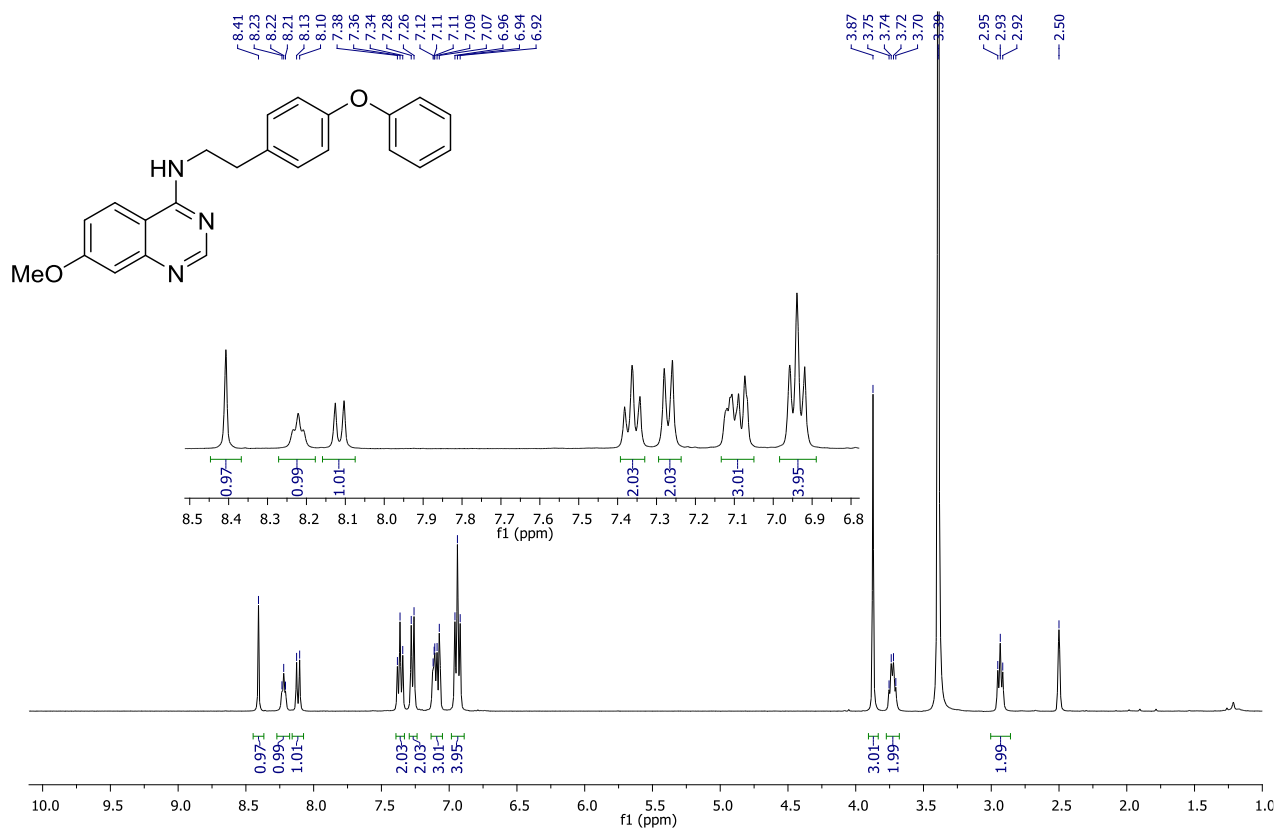
Espectro ^{13}C -RMN da 6-Metoxi-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (127)



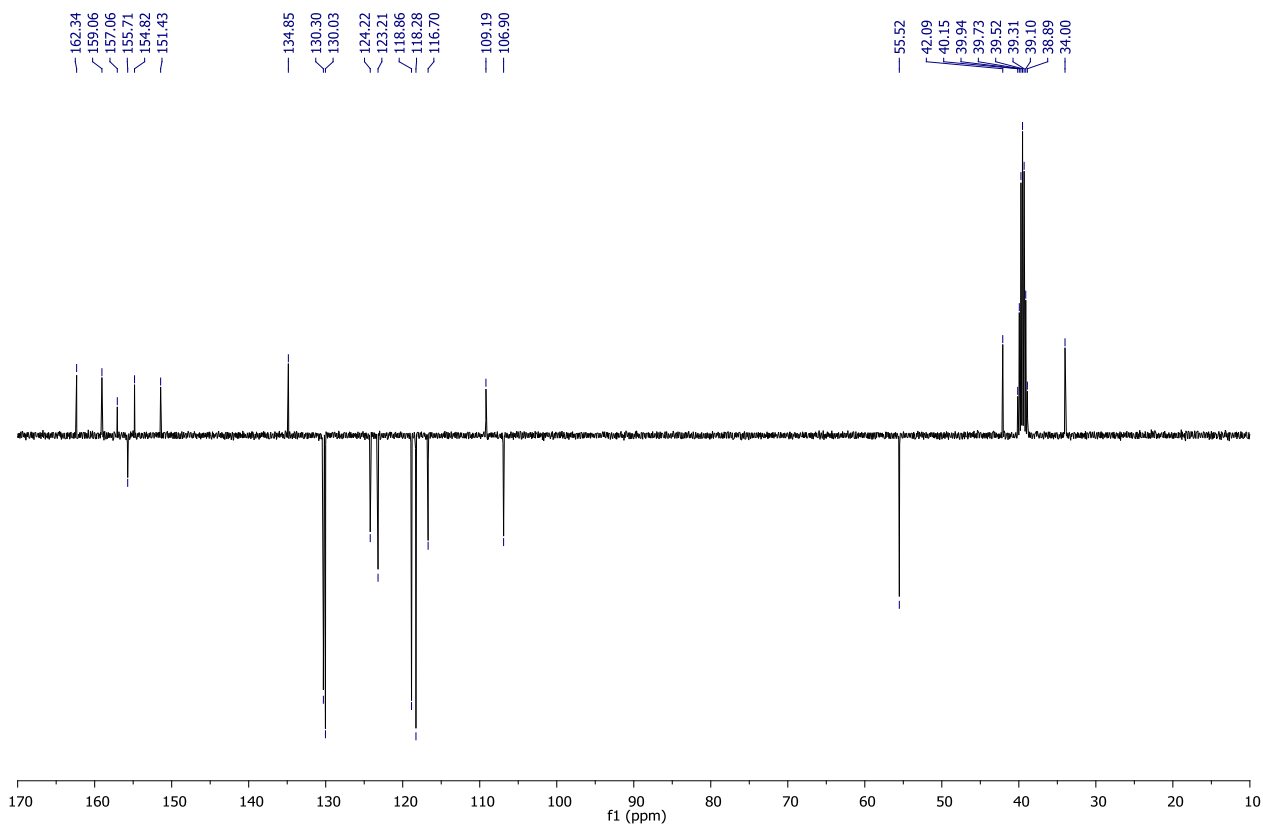
Espectro bidimensional HMQC da 6-Metoxi-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (127)



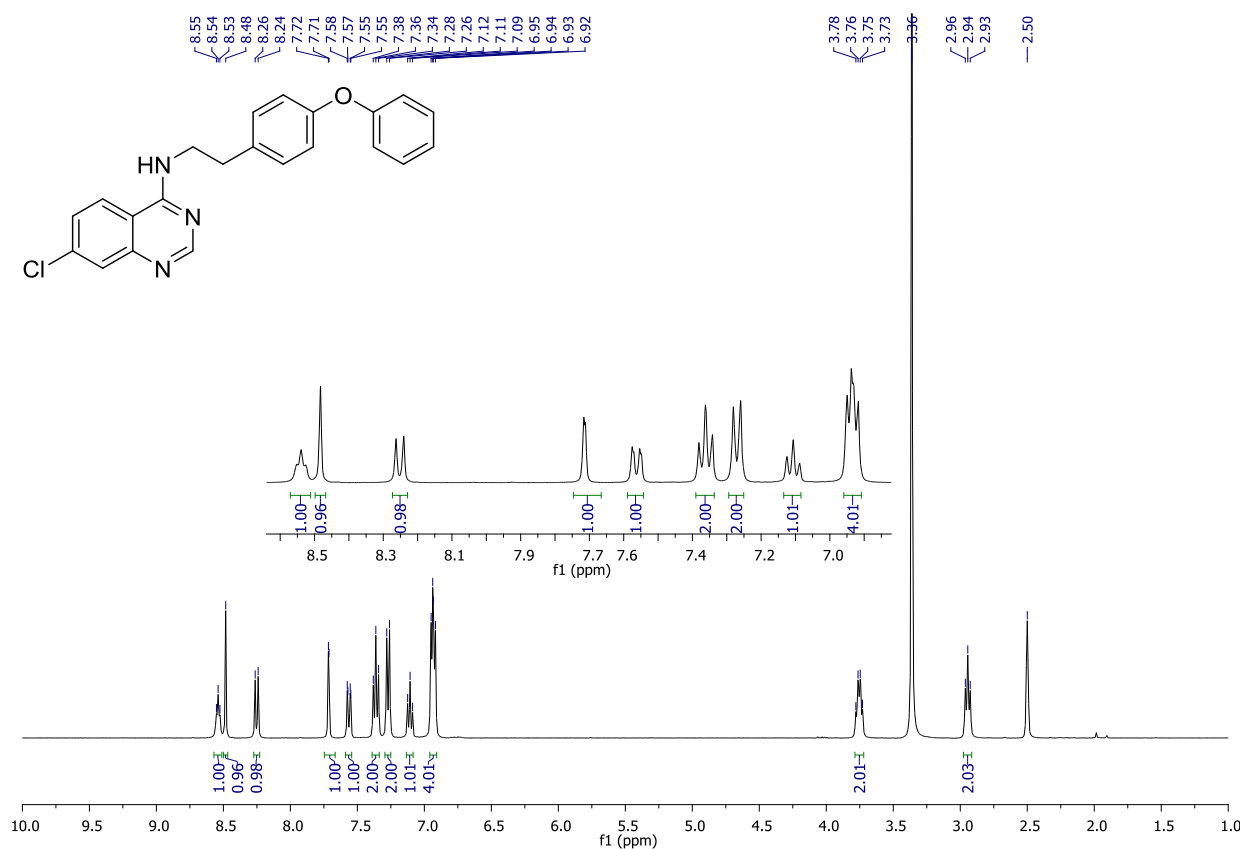
Espectro ¹H-RMN da 7-Metoxi-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (129)



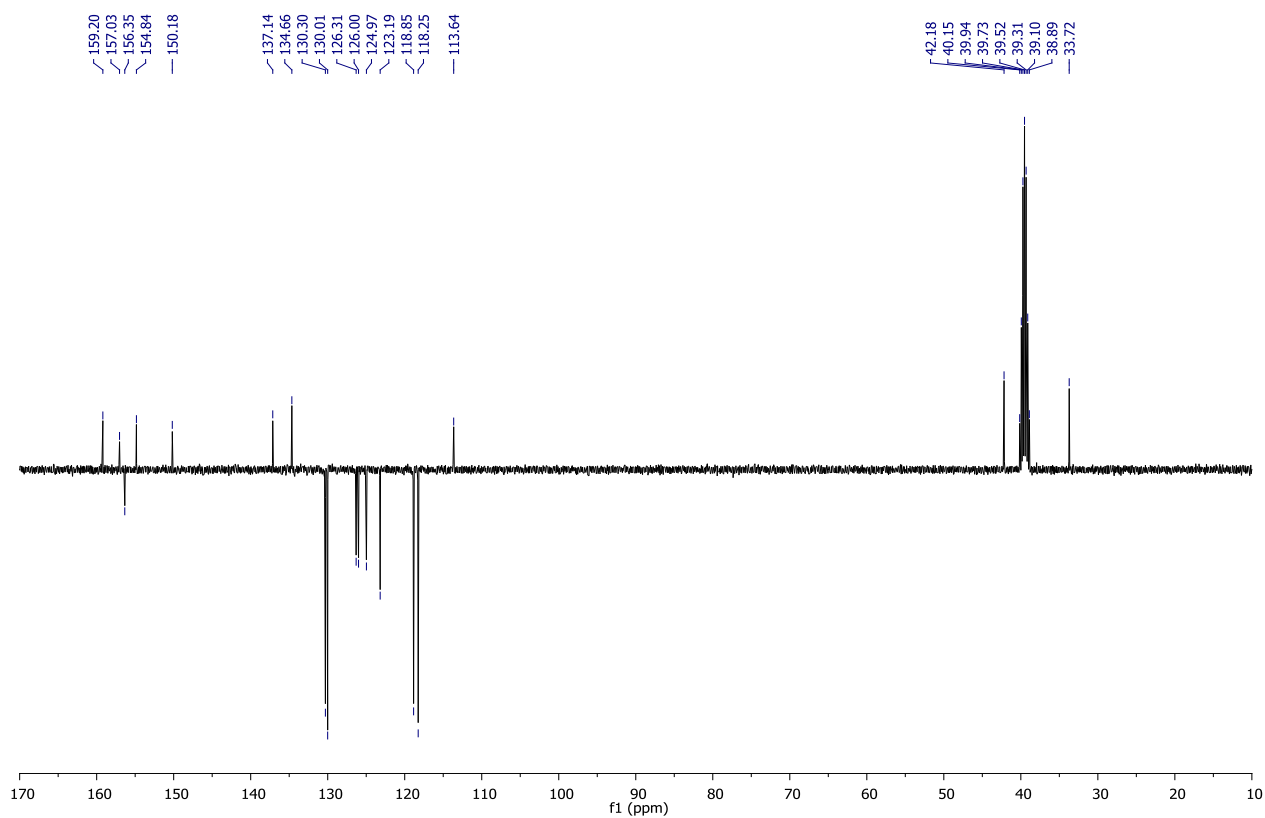
Espectro ^{13}C -RMN da 7-Metoxi-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (129)



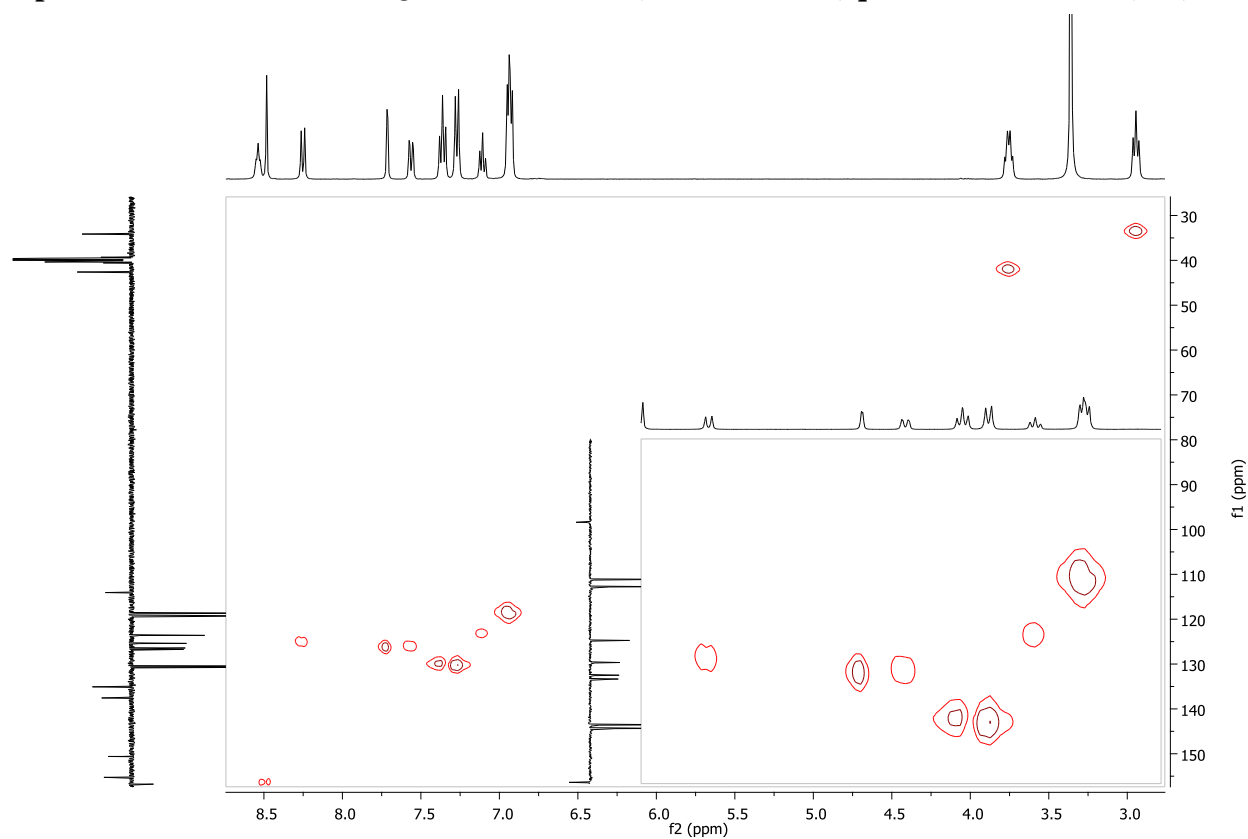
Espectro ^1H -RMN da 7-Cloro-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (128)



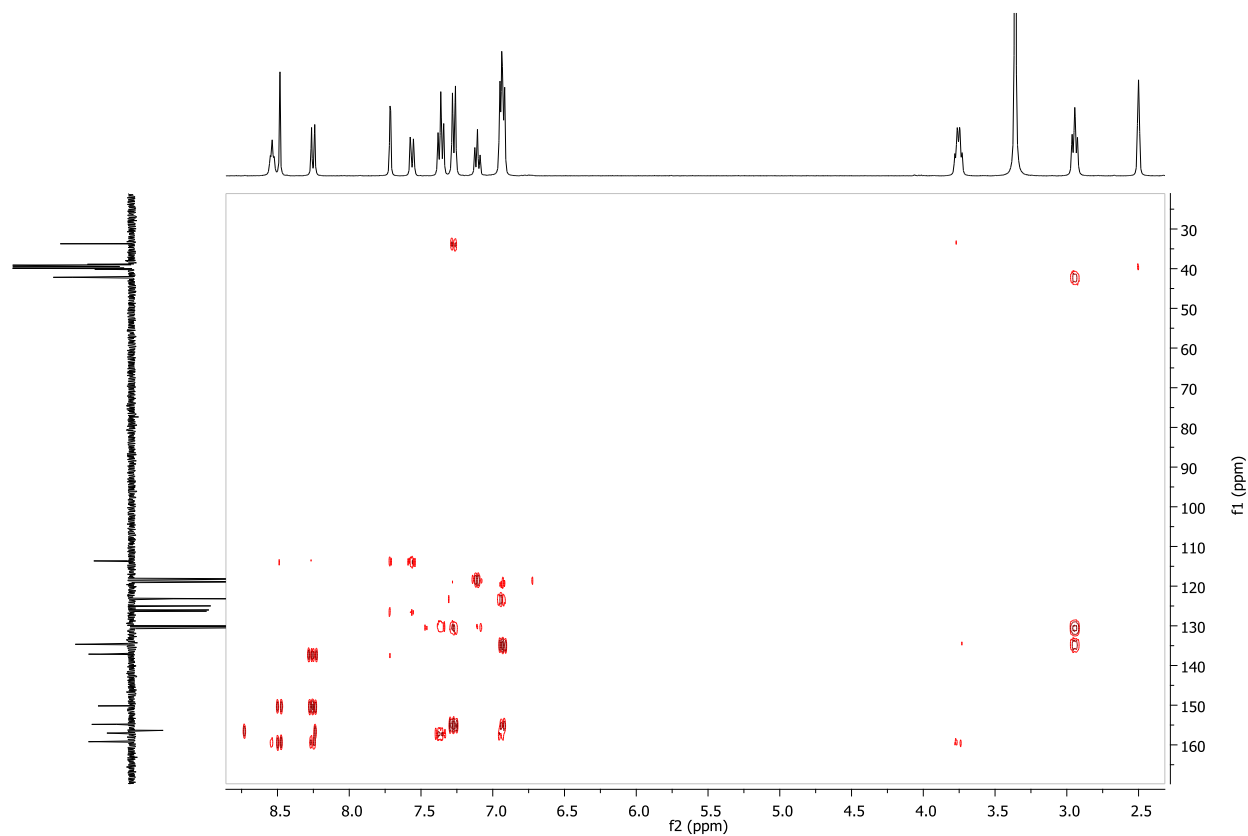
Espectro ^{13}C -RMN da 7-Cloro-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (128)



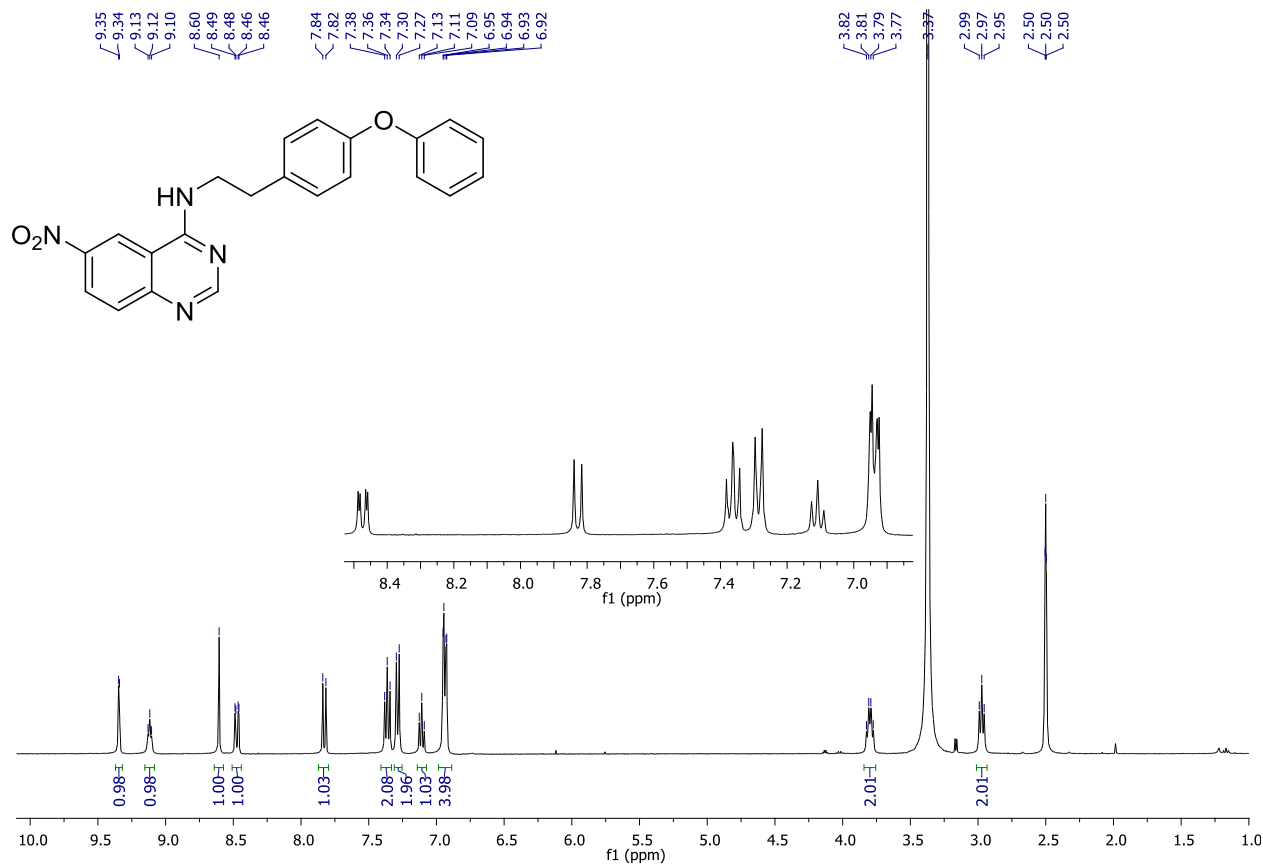
Espectro bidimensional HMQC da 7-Cloro-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (128)



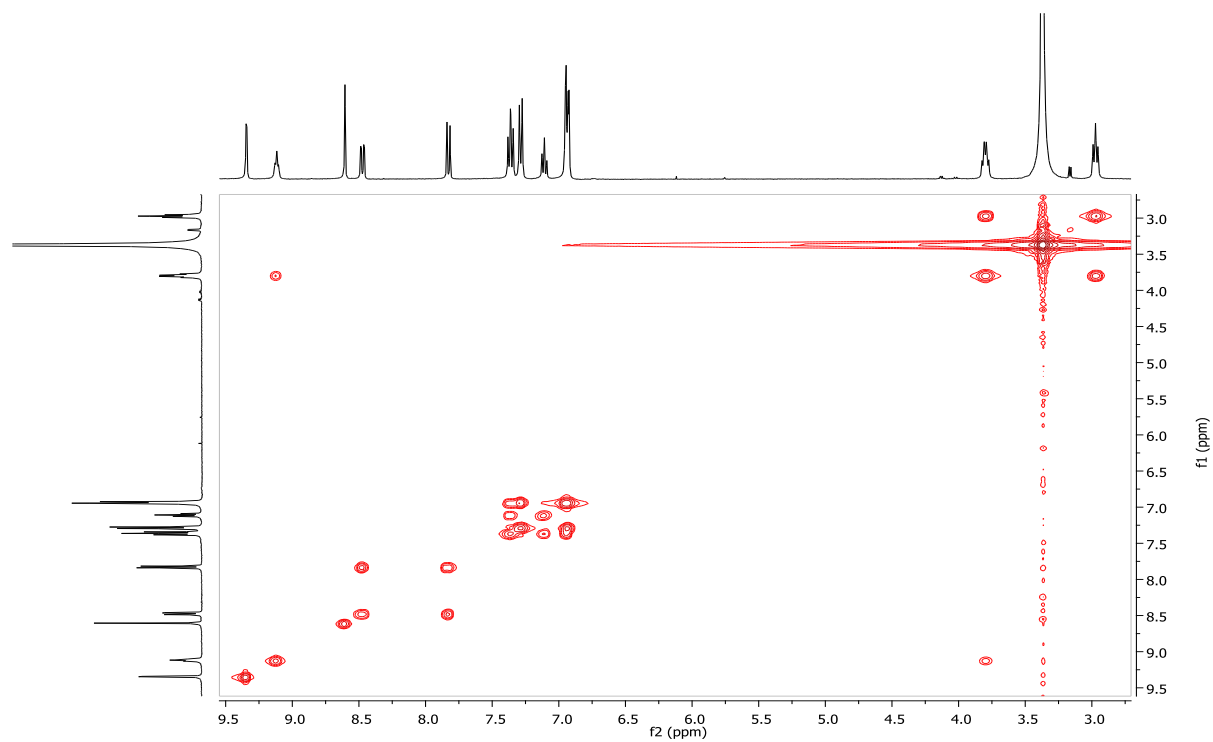
Espectro bidimensional HMBC da 7-Cloro-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (128)



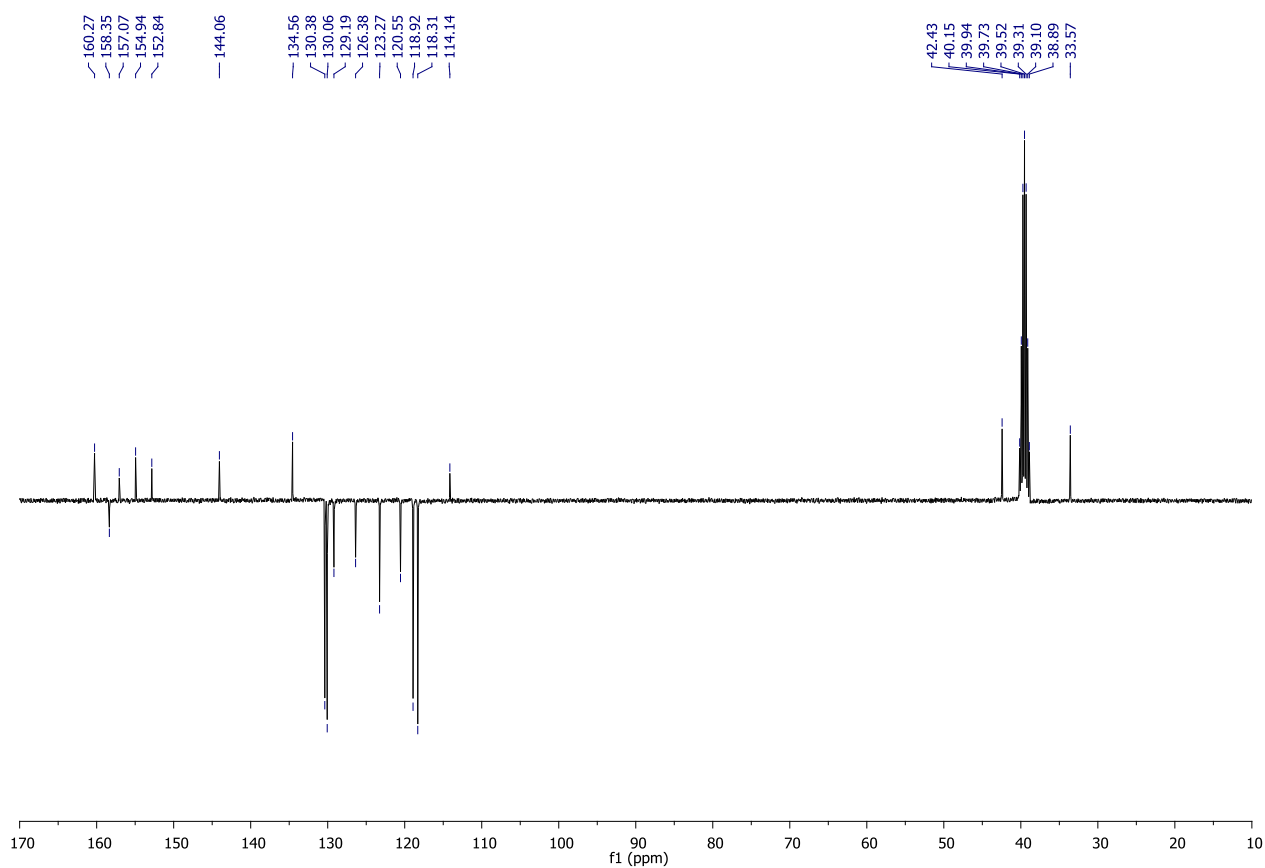
Espectro ^1H -RMN da 6-Nitro-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (130)

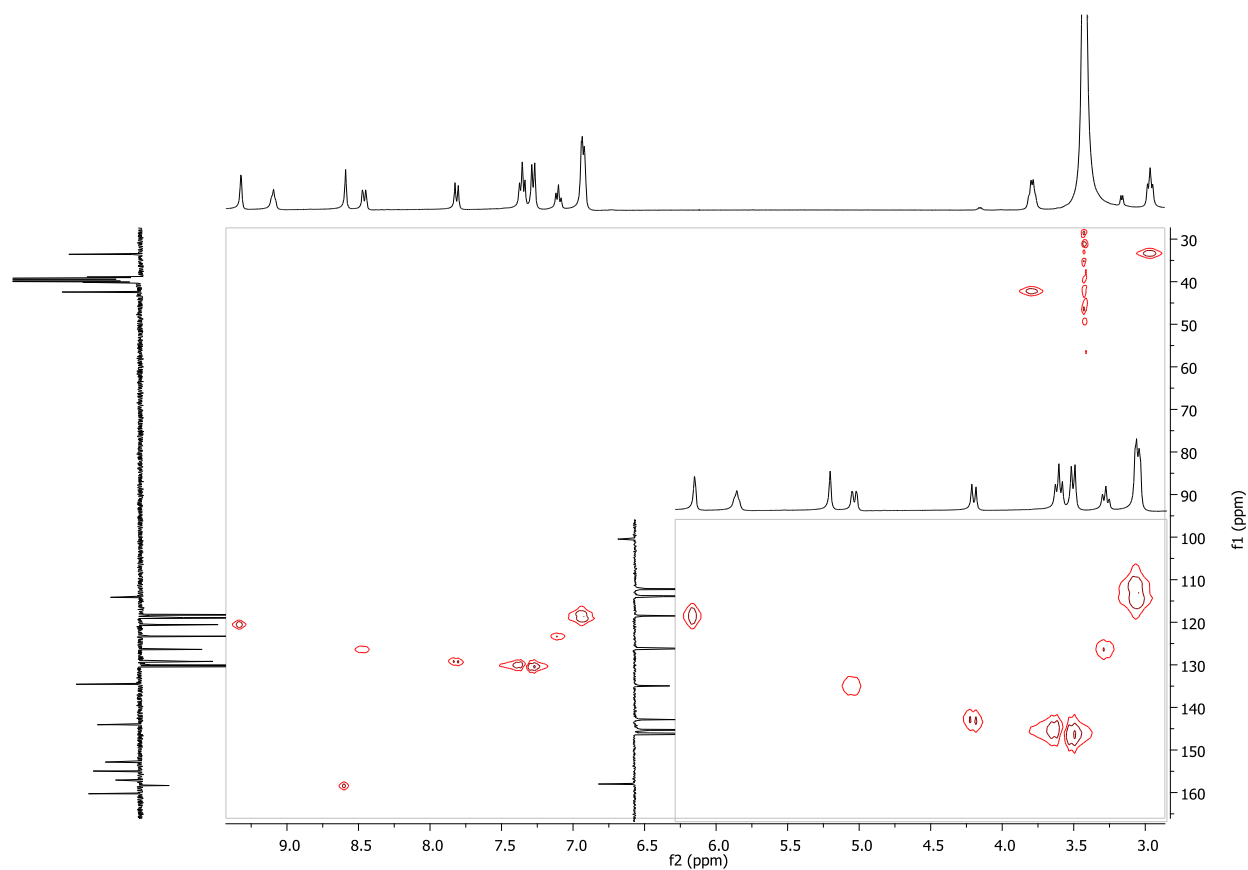
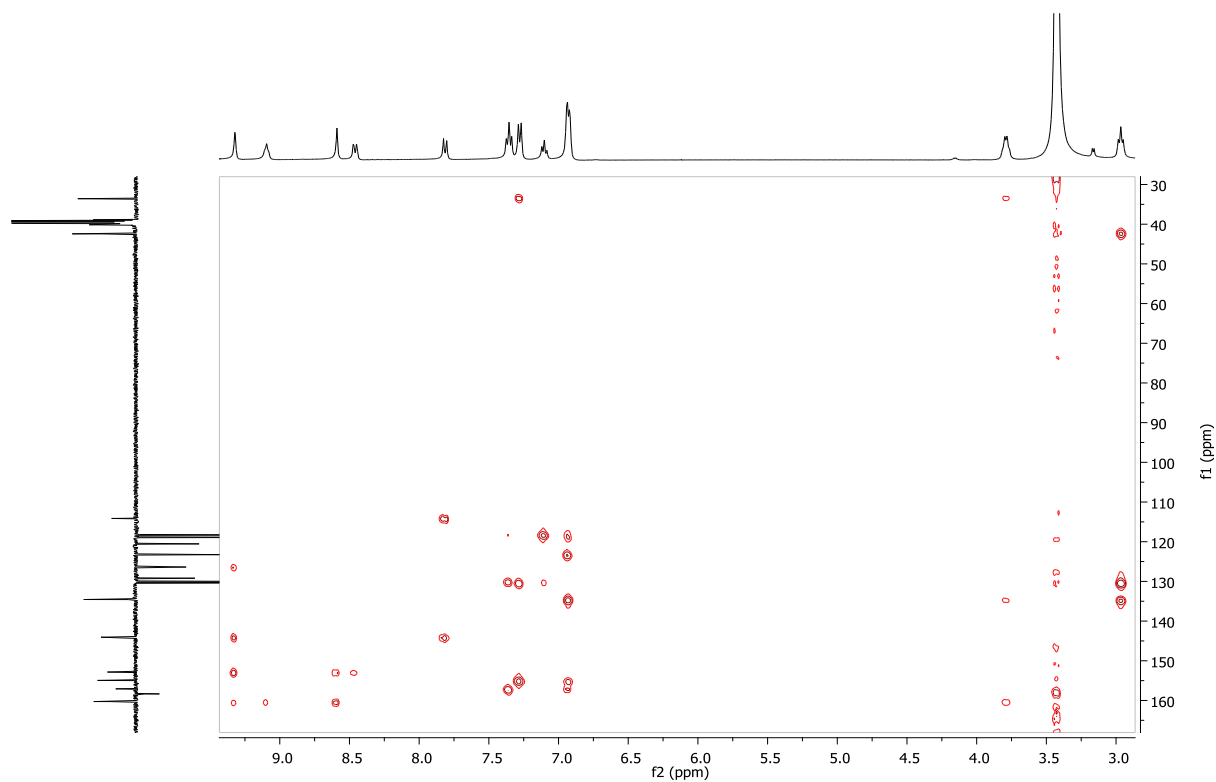


Espectro bidimensional COSY da 6-Nitro-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (130)

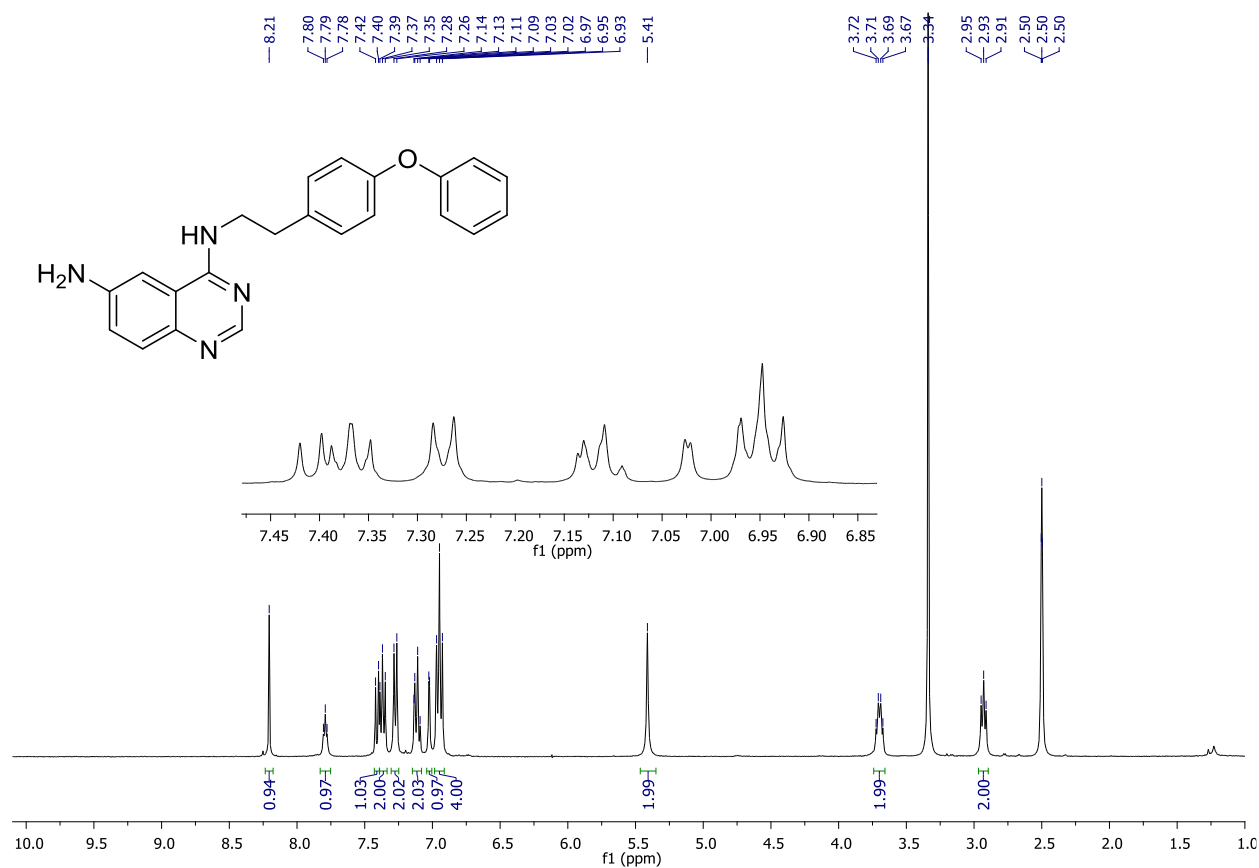


Espectro ¹³C-RMN da 6-Nitro-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (130)

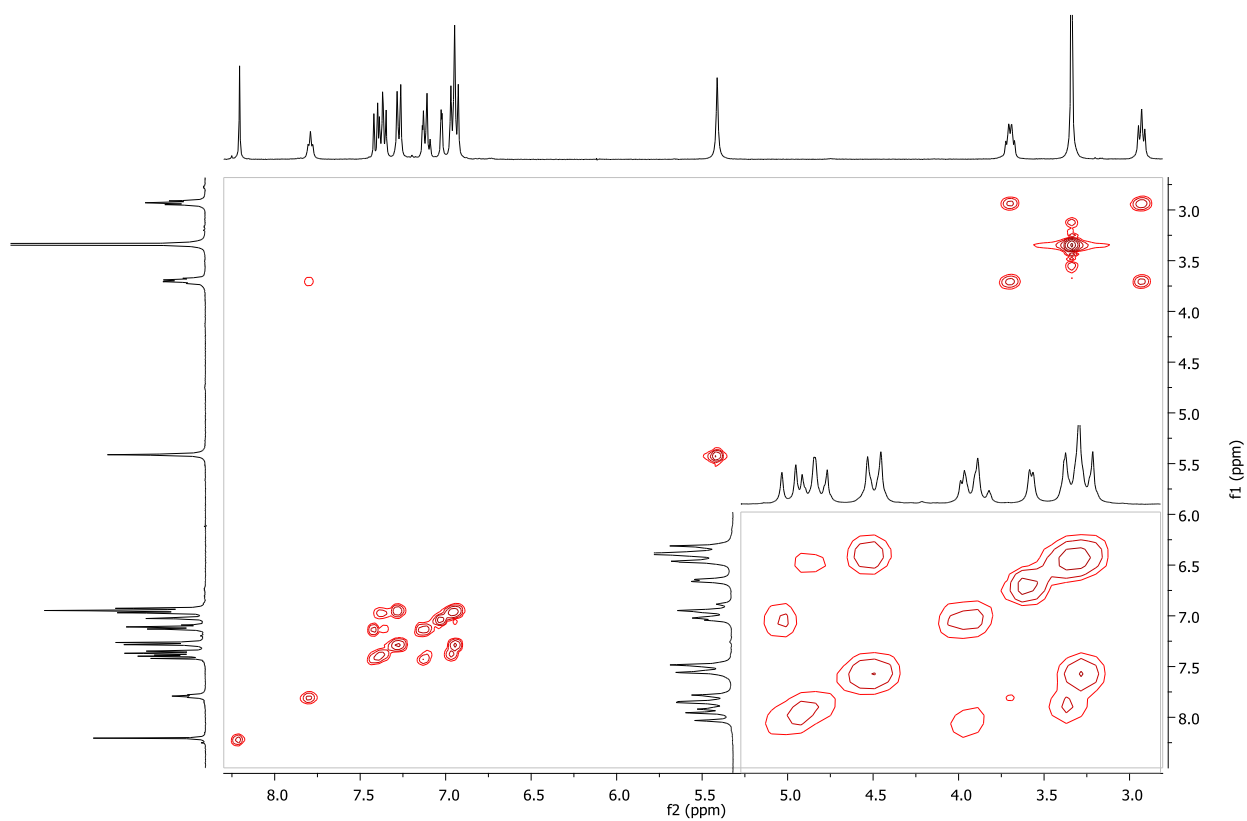


Espectro bidimensional HMQC da 6-Nitro-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (130)**Espectro bidimensional HMBC da 6-Nitro-*N*-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4-amina (130)**

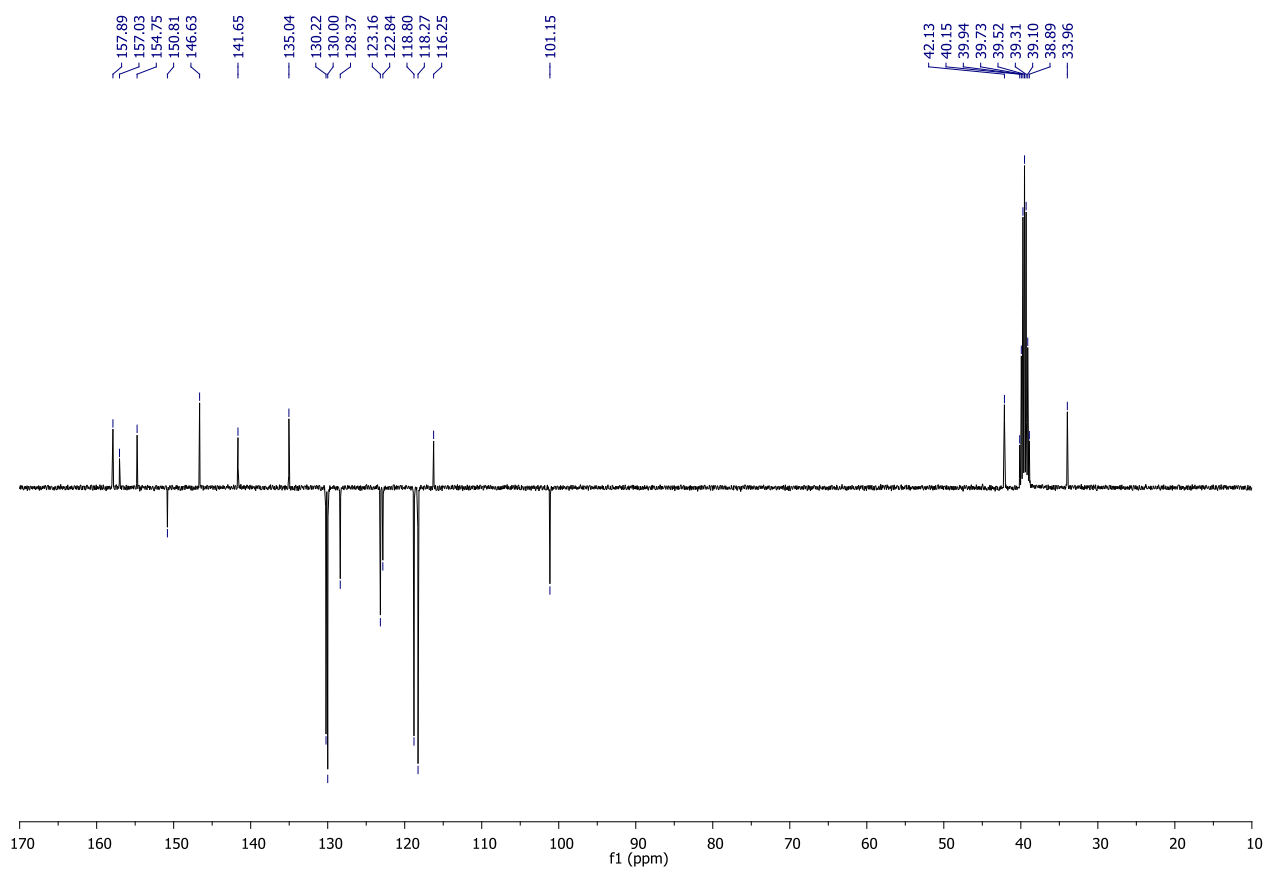
Espectro ^1H -RMN da N^4 -(4-fenoxifenetil)quinazolin-4,6-diamina (93)



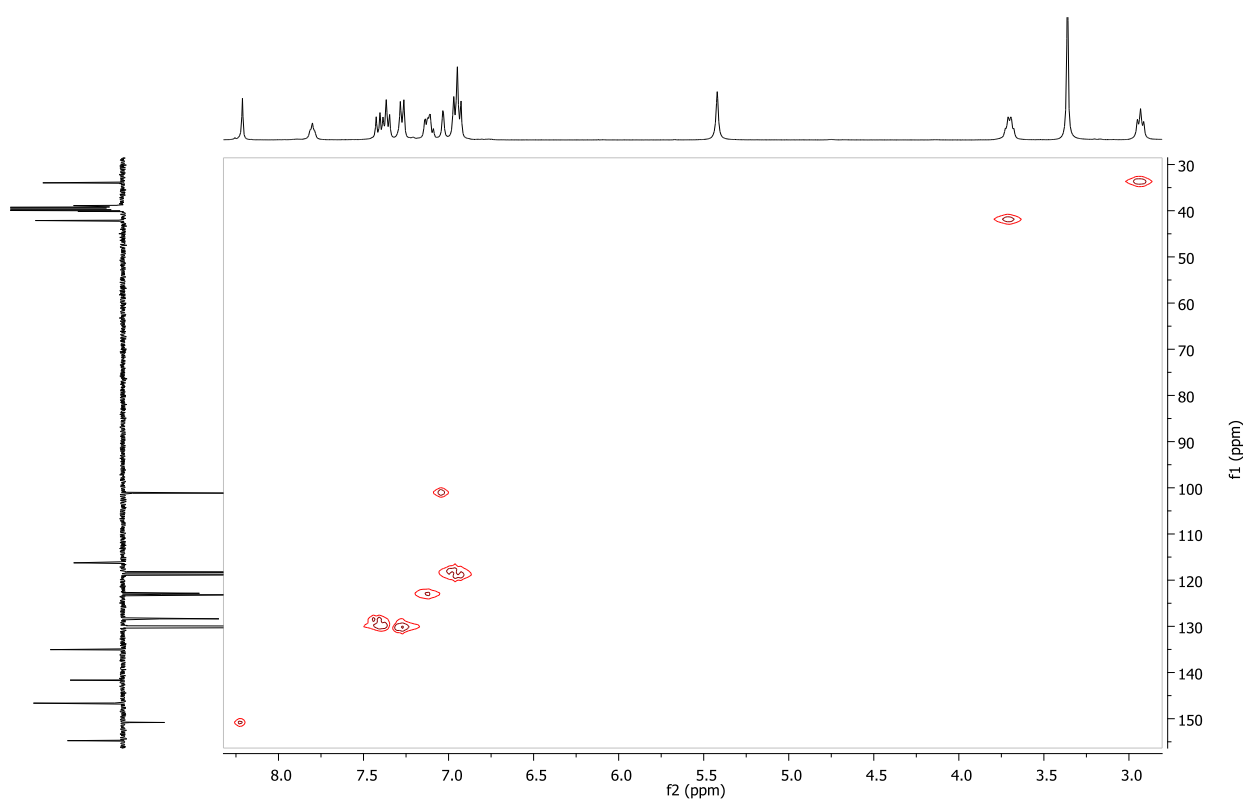
Espectro bidimensional COSY da N^4 -(4-fenoxifenetil)quinazolin-4,6-diamina (93)



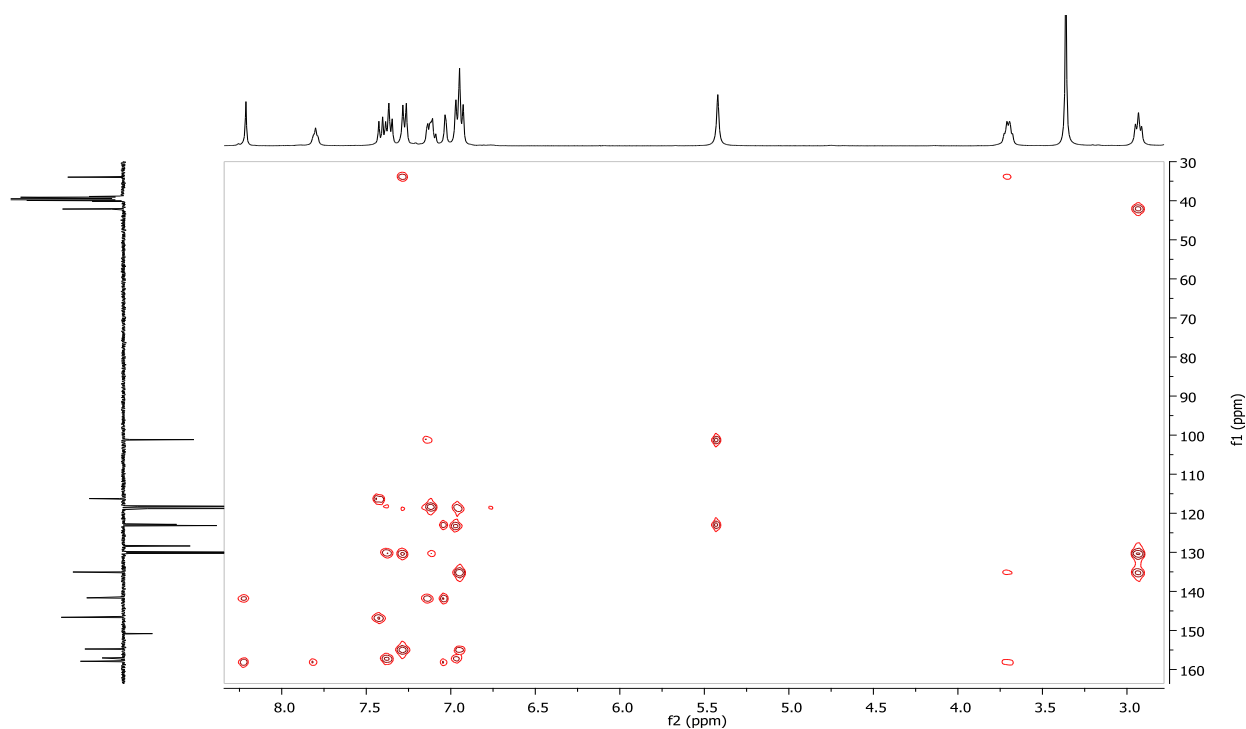
Espectro ^{13}C -RMN da N^4 -(4-fenoxifenetil)quinazolin-4,6-diamina (93)



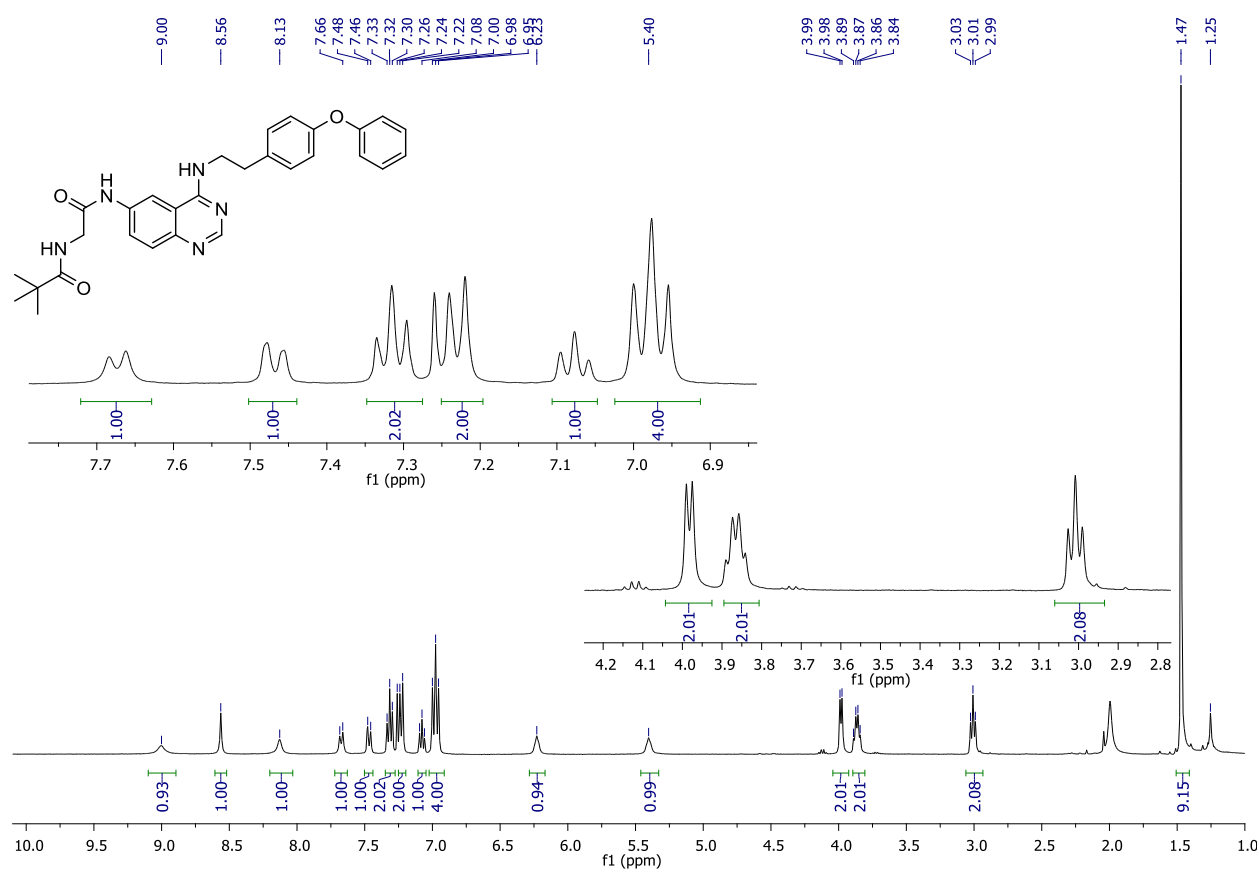
Espectro bidimensional HMQC da N^4 -(4-fenoxifenetil)quinazolin-4,6-diamina (93)



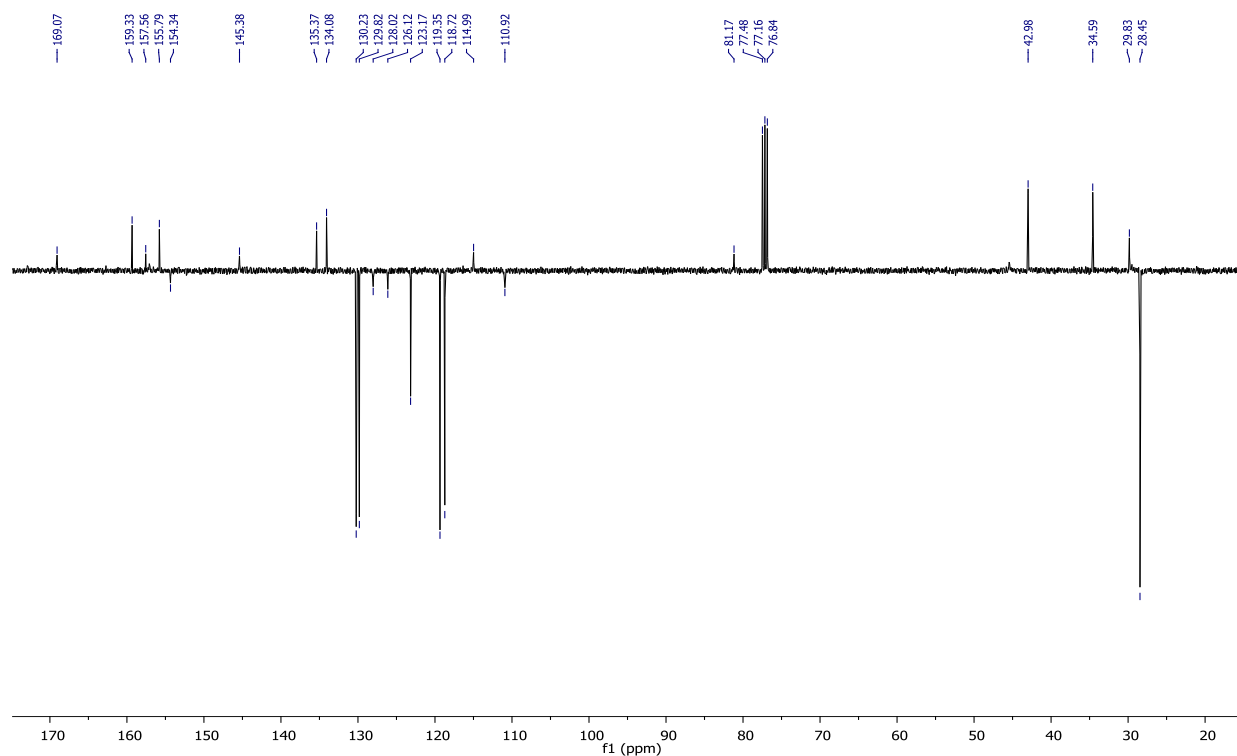
Espectro bidimensional HMBQ da N^4 -(4-fenoxifenetil)quinazolin-4,6-diamina (93)



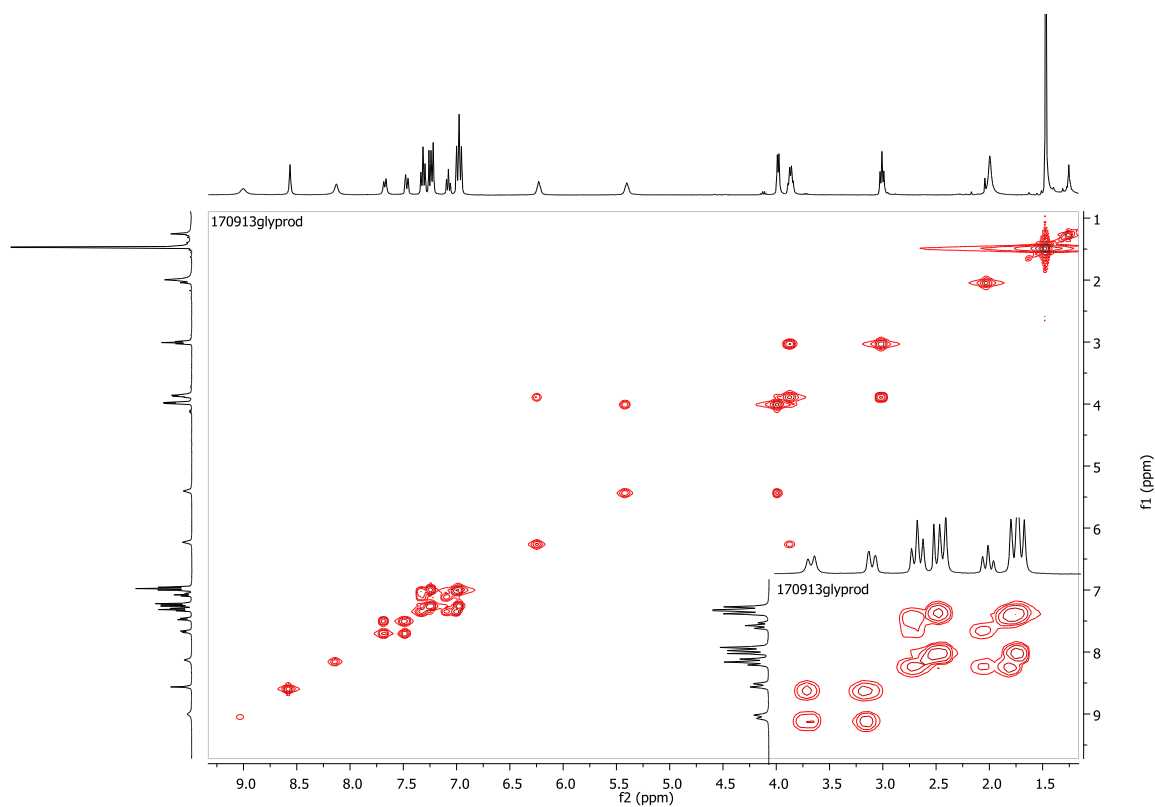
Espectro ^1H -RMN do $[N^4$ -(4-fenoxifenetil)quinazolin-4,6-diamina]-Gly-Boc (145)



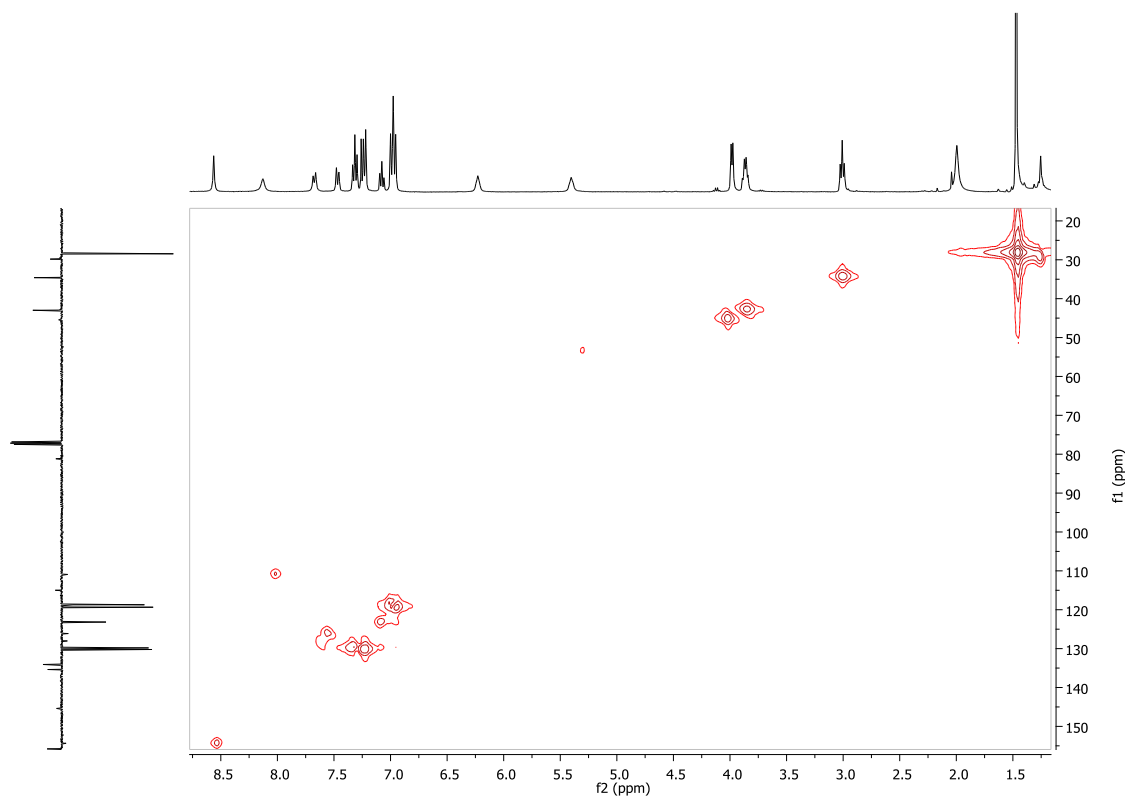
Espectro ^{13}C -RMN do $[N^4\text{-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4,6-diamina}]\text{-Gly-Boc (145)}$



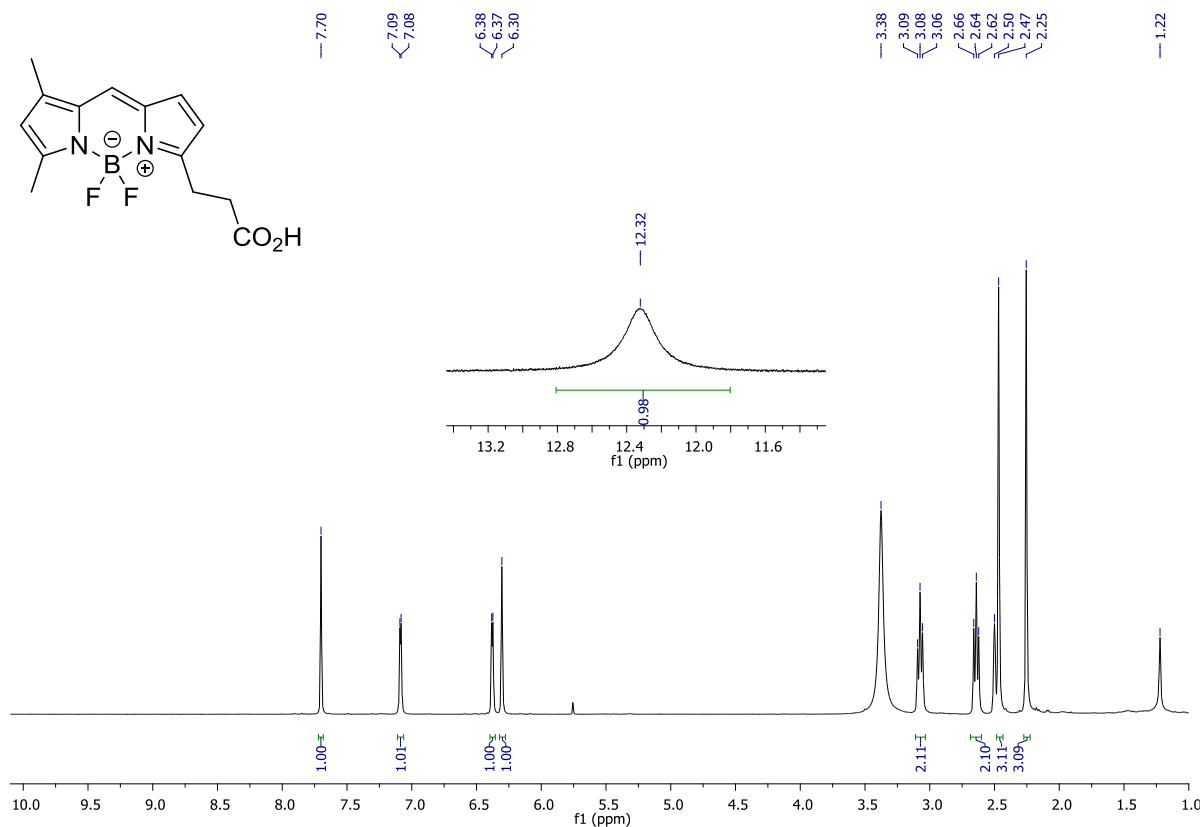
Espectro bidimensional COSY do $[N^4\text{-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4,6-diamina}]\text{-Gly-Boc (145)}$



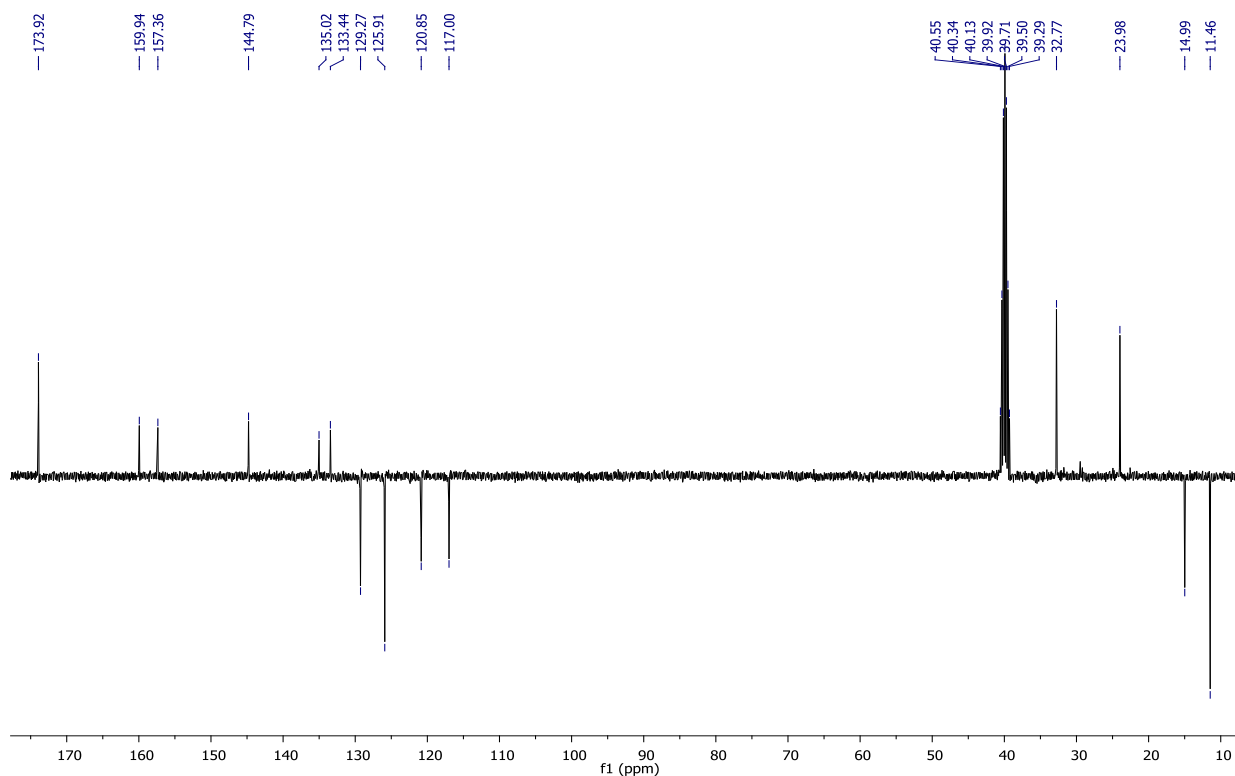
Espectro bidimensional HMQC do do [N⁴-(4-fenoxifenetil)quinazolin-4,6-diamina]-Gly-Boc (145)



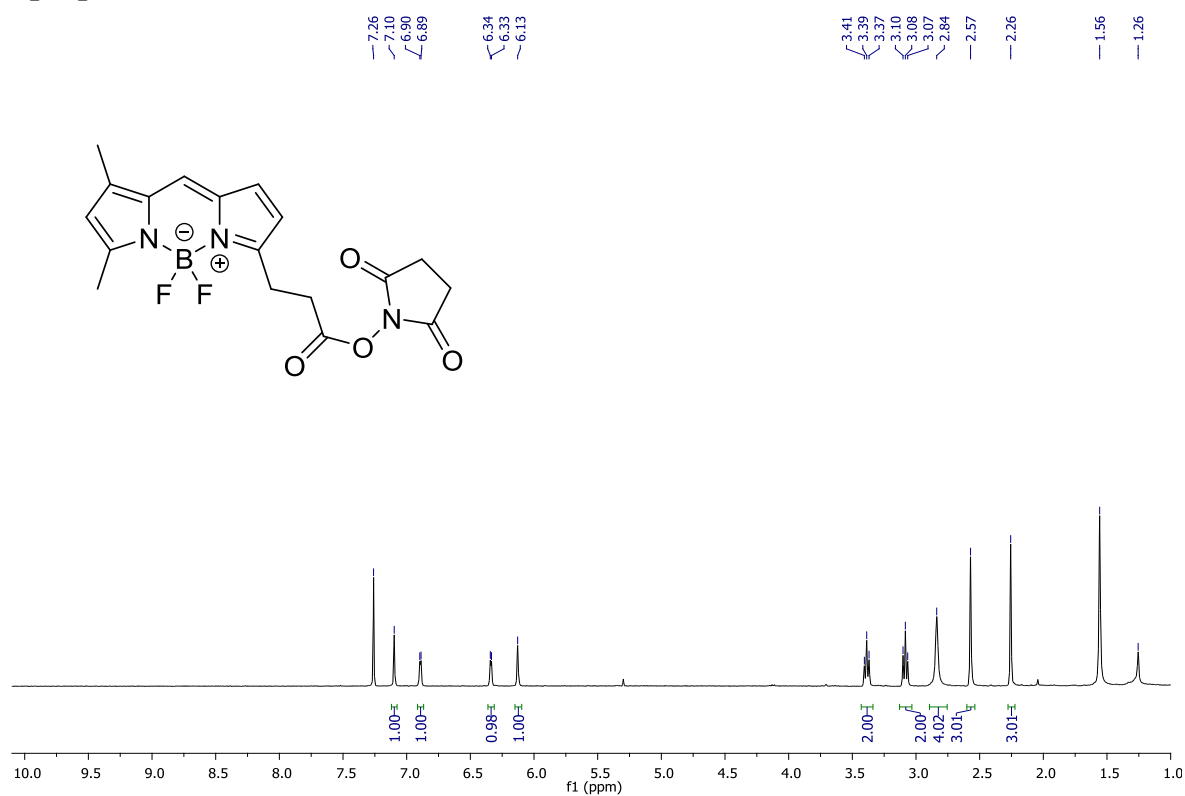
Espectro ¹H-RMN do ácido 3-[4,4-Difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-il]propiónico (136) - BODIPY-FL



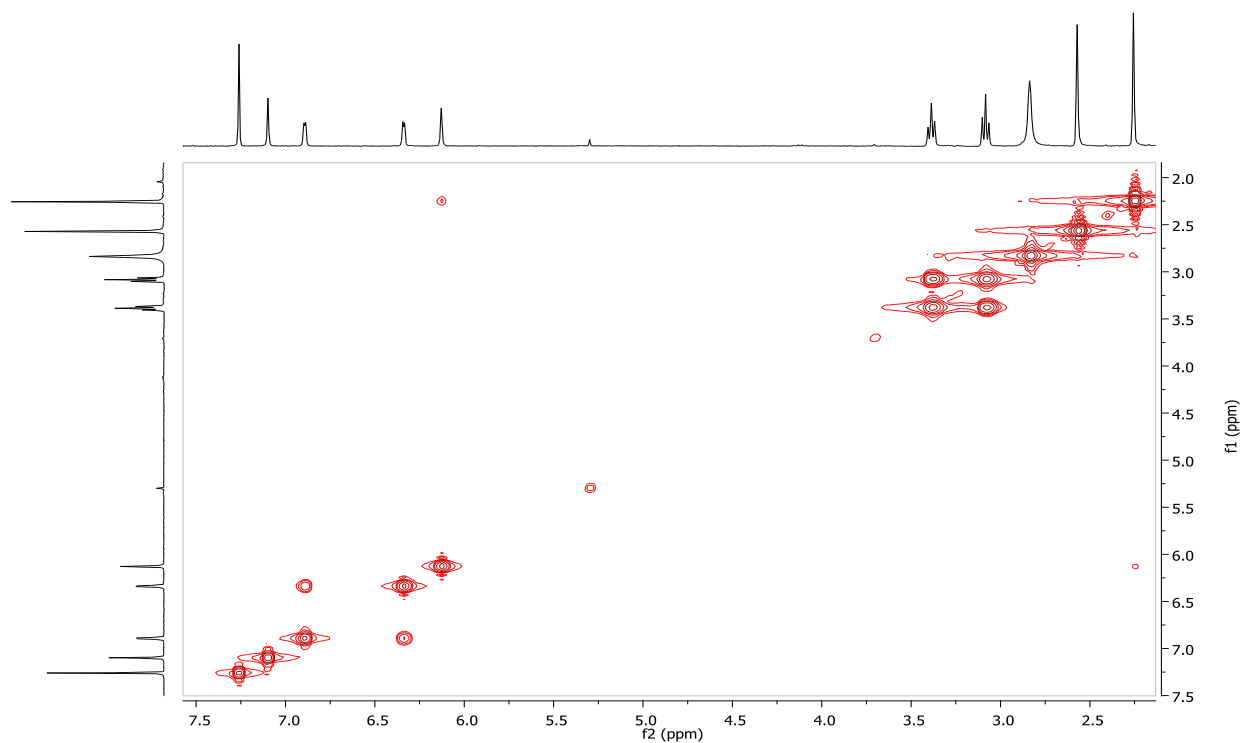
Espectro ^{13}C -RMN do ácido 3-[4,4-Difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-il]propiónico (136) - BODIPY-FL



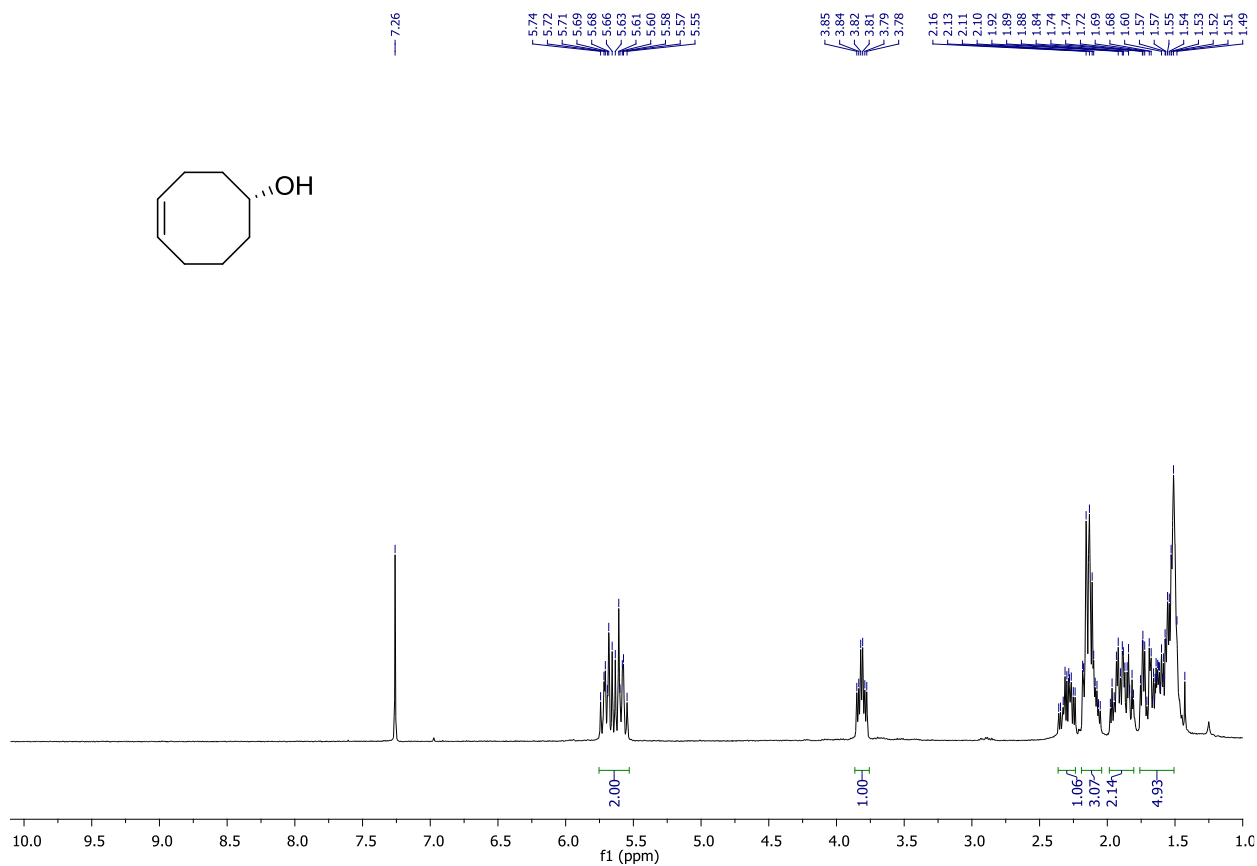
Espectro ^1H -RMN do 3-[4,4-Difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-il]propanoato de succinimidilo (137)

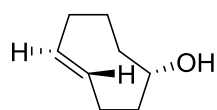


Espectro bidimensional COSY do 3-[4,4-Difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-il]propanoato de succinimidilo (137)



Espectro ^1H -RMN do composto (Z)-Cicloocten-4-ol (142)



Espectro ^1H -RMN do composto TCO (143)

maioritário

